

02.08.03
02 DEC 2004

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 15 AUG 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 25 841.4

Anmeldetag:

03. Juni 2002

Anmelder/Inhaber:

ProteoSys AG, Mainz/DE

Bezeichnung:

Differentielle Anzeige von markierten
Molekülen

IPC:

G 01 N, C 12 Q

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 18. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzer

Anmelderin:
ProteoSys AG
Carl-Zeiss-Str. 51

55129 Mainz

Unser Zeichen: P 40905 DE

03. Juni 2002 TM/Ba

Beschreibung

Differentielle Anzeige von markierten Molekülen

Anwendungsgebiet und Stand der Technik

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Ortsverteilung von mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten mit jeweils mengenspezifischem Strahlungstyp auf einer gemeinsamen Trägerfläche.

10

Eine wichtige Anwendung proteomischer Studien ist die Bestimmung des Unterschieds der Häufigkeiten bestimmter Proteine oder Proteinisomeren zwischen zwei oder mehr experimentell interessanten Regimen, beispielsweise der Häufigkeit von Proteinen aus Kontrollzellen, Geweben oder Organismen, im Vergleich zu der entsprechenden Häufigkeit aus pharmakologisch behandelten Zellen, Geweben oder Organismen.

15

Die Proteinintensität für Proteinspots von unterschiedlichen Gelen aus unterschiedlichen experimentellen Regimen in der Untersuchung werden typischerweise verglichen, um zu bestimmen, ob die Menge an Protein in diesen Proteinspots sich zwischen den experimentellen Regimen unterscheidet. Dies ist ein Prinzip differentieller Darstellung, die auch als

20

Multicolouranalyse bezeichnet wird. Die Zuordnung von Proteinspotkoordinaten und die Identifizierung entsprechender Proteinspots auf verschiedenen 2D-Gelen wird Matchingverfahren (matching procedure) genannt und ist wegen des nicht reproduzierbaren Verhaltens verschiedener Gele, die durch 2D-PAGE erzeugt werden, potentiell problematisch. 5 Deshalb ist das Matchingverfahren ein zeitaufwändiger Schritt und ist derzeit nur wenig automatisierbar.

Es kann beispielsweise durch Messen der verschiedenen Proben in verschiedenen experimentellen Systemen eine grobe Multicolouranalyse 10 durchgeführt werden. Hierbei können beispielsweise Proteine aus unterschiedlichen Proben in jeweils separaten 2-D-PAGE-Experimenten behandelt werden, gefolgt von einem Nachweis der Spots, die Proteinen in den verschiedenen 2D-PAGE-Gelen entsprechen, und Vergleich der für 15 jede Proben von jedem Gel oder jeder Gruppe von replizierten Gelen erhaltenen Spotmuster. Die Spotmuster werden typischerweise in graphischen Gel-Bilddateien gespeichert, wie z. B. TIFF-Dateien. Herkömmliche Softwareprogrammalgorithmen richten diese Gel-Bilddateien zueinander aus, so dass Pixel in allen Bildern mit Pixeln aus anderen 20 Bildern verglichen werden können. Typischerweise wird ein „zusammengesetztes Gel-Bild“ (composite gel image) aus replizierten 2D-PAGE-Gel-Bildern für eine Probe hergestellt, das Mittelwerte der Spotintensitäten von allen Replikatgelen für eine bestimmte Probe enthält. Die Kompositgele aus verschiedenen Proben werden typischerweise miteinander 25 verglichen, um Unterschiede in Proteinhäufigkeiten zwischen den Proben aufzuzeigen. Die beiden Haupteinschränkungen dieses Ansatzes sind Spotmatching, das die korrekte Zuordnung der entsprechenden Spots ermöglicht und die quantitative Auswertung der Spots, die einen Vergleich der Proteinmengen in Spots aus verschiedenen 2D-Gelen ermöglicht. 30

Um eine feinere differentielle Darstellung zu erzeugen, werden Analysatmoleküle aus verschiedenen Proben typischerweise mit Reagenzien markiert bzw. modifiziert, so dass die Proben vermischt und gemeinsam analysiert werden können. So kann das aufwändige und fehlerträchtige Matchingverfahren vermieden werden. Anschliessend können die Proteine von jeder Probe aufgrund ihrer Markierung unabhängig vom Vorhandensein der Proteine aus der (den) anderen Probe(n) nachgewiesen werden.

- 10 Ein Beispiel sind die DIGE-Fluoreszenzreagenzien auf Basis von Cy-
Farbstoffen, die von Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
angeboten werden. Proteine aus beiden Proben werden mit unterschied-
lichen Fluoreszenzreagenzien separat markiert, dann vermischt und
gemeinsam der Elektrophorese in 2D-PAGE unterzogen. Die verschie-
15 denen Fluoreszenzgruppen in jeder Probe werden durch unterschiedli-
che Wellenlängen angeregt und emittieren Licht bei unterschiedlichen
Wellenlängen. Durch Verwendung geeigneter Lichtfilter ist es möglich,
Bilder von Proteinen jeder Probe zu erhalten, unabhängig von der Ver-
teilung der Proteine aus der anderen Probe. Diese Bilder können dann
20 durch entsprechende Softwarepakete analysiert werden.

- Ein weiterer Ansatz für eine feinere differentielle Darstellung ist die Mar-
kierung von Analysatmolekülen aus verschiedenen Proben mit radioaktiv
strahlenden Isotopen. Die radioaktive Markierung von Analysatmolekü-
25 len und ihr Nachweis durch geeignete Detektoren ist um mehrere Grö-
ssenordnungen empfindlicher als andere Verfahren, beispielsweise das
oben genannte Verfahren unter Verwendung von Cy-
Farbstoffen.

Ein Analyseverfahren, bei dem Analysatmoleküle mit radioaktiv strah-
30 lenden Isotopen markiert werden, ist beschrieben in:

Monribot-Espagne C, Boucherie H, Differential gel exposure, a new methodology for the two-dimensional comparison of protein samples. Proteomics, 2002, 2:229-240.

- 5 Bei der Markierung von Analysatmolekülen mit radioaktiv strahlenden Isotopen ist es notwendig, die radioaktive Strahlung bzw. die Aktivität der Isotope zu bestimmen. Die Kerne radioaktiver Isotope sind instabil. Sie neigen dazu unter Freisetzung von Partikeln oder Photonen spontan zu zerfallen. Durch radioaktive Substanzen werden mehrere verschiedene Arten von Partikeln freigesetzt. Von allgemeiner Bedeutung sind
10 das Elektron, das Positron, das Alphateilchen und das Neutron. Die Emission dieser Partikel ist häufig, aber nicht immer, begleitet von der Ausstrahlung von Gammastrahlen. Eine andere Art des radioaktiven Zerfalls ist der spontane Einfang eines Elektrons der K-Schale durch
15 den Kern, was als K-Elektroneneinfang bekannt ist. Strahlungsdetektoren sind Geräte, die entwickelt wurden, um diese verschiedenen Arten von Strahlung nachzuweisen.

Die folgenden räumlich auflösenden Detektoren werden zur quantitativen Analyse von radioaktiven Molekülen verwendet, die in einem Array
20 oder auf einer Oberfläche, wie einem DNA-Array oder einem 2D-PAGE-Proteingel, vorhanden sind und ersetzen zu diesem Zwecke einen photographischen Film. Von den vier zitierten Beispielen beruhen die Detektortypen 2, 3 und 4 auf den obigen Prinzipien.

25

1. Autoradiographie mit Phosphorimagern, die gemäss der Prinzipien von Geräten arbeiten, die eine Bildplatte verwenden, wie die derzeit von den Firmen Fuji Photo Film Co. Ltd (Tokio), Packard Bioscience GmbH (Dreieich Deutschland), AGFA-Gevaert N.V. (Mortsel, Belgien) oder
30 Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) angebotenen Geräte. Amemiya Y, Miyahara J. Imaging plate illuminates many fields. Nature, 1988, 336:89-90.

Miyahara, J. The imaging plate: a new radiation image sensor. Chemistry Today, 1989, 223: 29-36.

- 5 2. PPAC-Ionisationsgaskammern (parallel plate avalanche chamber), die mit Mikrokanalplattenanalysatoren (Microchannel Plate Analysers) zum Nachweis von Betapartikeln gekoppelt sind, wie der Beta Imager, der von BioSpace Measures (Paris), und ein ähnliches Gerät, das von Packard Bioscience (Dreieich, Deutschland) vertrieben wird.

10

Bei diesen Imagern wird Licht von den PPAC durch eine Linse in eine Mehrfaserbildverstärkerröhre fokussiert, von der das Signal durch eine CCD-Kamera erfasst wird.

- 15 Laniece P, Charon Y, Dumas S, Mastrippolito R, Pinot, L, Tricoire H, Valentin L. HRRI: a high resolution radioimager for fast, direct quantification in in situ hybridization experiments. Biotechniques, 1994, 17:338-345.

- 20 Crumeyrolle-Arias M, Latouche J, Laniece P, Charon Y, Tricoire H, Valentin L, Roux P, Mirambeau G, Leblanc P, Fillion G, et al. "In situ" characterization of GnRH receptors: use of two radioimagers and comparison with quantitative autoradiography. J. Recept Res, 1994, 14:251-265.

25

Jeavons, AG. Method and apparatus for quantitative autoradiography analysis. 11. August 1992. USA-Patent 5138168. Inhaber: Oxford Position Systems Limited.

- 30 Decristoforo C, Zaknun J, Kohler B, Oberladstaetter M, Riccabona G. The use of electronic autoradiography in radiopharmacy. Nucl. Med. Biol, 1997, 24: 361-365.

3. Geräte wie der Micro Imager (BioSpace Measures, Paris), bei dem eine Szintillationsfläche zum Nachweis von Beta- Gamma- und Alpha-
partikeln mit Mikrokanalplattenanalysegeräten gekoppelt ist. In diesen
5 Imagern tritt Licht von der Szintillationsfläche in eine Mehrfaserbildver-
stärkerröhre ein, von der das Signal durch eine CCD-Kamera eingefan-
gen wird.

10 Laniece P, Charon Y, Dumas S, Mastrippolito R, Pinot, L, Tricoire H,
Valentin L. HRRI: a high resolution radioimager for fast, direct quantifica-
tion in in situ hybridization experiments. Biotechniques, 1994, 17:338-
345.

15 Crumeyrolle-Arias M, Latouche J, Laniece P, Charon Y, Tricoire H,
Valentin L, Roux P, Mirambeau G, Leblanc P, Fillion G, et al. "In situ"
characterization of GnRH receptors: use of two radioimagers and com-
parison with quantitative autoradiography. J. Recept Res, 1994, 14:251-
265.

20 Jeavons, AG. Method and apparatus for quantitative autoradiography
analysis. 11. August 1992. USA-Patent 5138168. Inhaber: Oxford Posi-
tion Systems Limited.

25 Decristoforo C, Zaknun J, Kohler B, Oberladstaetter M, Riccabona G.
The use of electronic autoradiography in radiopharmacy. Nucl. Med.
Biol. 1997, 24: 361-365.

4. Szintillationskristallarrayimager, die einen räumlich auflösenden Pho-
tomultiplier verwenden, wie die MPD-Imager (Multi Photon Detection),
30 die von BioTraces Inc. (Herndon VA, USA) und ProteoSys AG (Mainz,
Deutschland) vertrieben werden.

Drukier AJ, Sagdejev IR, Ultralow background multiple photon detector. 2. Februar 1999. USA Patent 5,866,907. Inhaber: BioTraces, Inc. (Herdon, VA).

- 5 Im Gegensatz zu den obigen Detektortypen 2, 3 und 4 ist eine Phosphorimagerbildplatte (Phosphorimager Imaging Plate, Phosphorimager-IP) ein filmartiger Strahlungsbildsensor, der speziell konstruierten Phosphor enthält, der die Strahlungsenergie aufnimmt und speichert, damit sie zu einem späteren Zeitpunkt wieder freigegeben und in einem geeigneten
- 10 Phosphorimagerauslesegerät gemessen werden kann. Ein Phosphorimagergerät ist ein kombiniertes System bestehend aus einem Phosphorimagerauslesegerät und einer Phosphorimagerbildplatte, das nachfolgend als Phosphorimager bezeichnet wird. Ein Phosphor ist ein Pulver oder eine kristalline Substanz, die nach Einwirkung von Photonen bestimmter Eigenschaften oder chemischer Reaktionen Licht emittiert.
- 15 Lichtemission (Lumineszenz) von einem Phosphor kann momentane (Fluoreszenz), verzögerte (Phosphoreszenz) oder photostimulierte Lumineszenz (PSL) sein. Der Phosphor der Phosphorimager-IP nutzt das PSL-Phänomen, das weder Fluoreszenz noch Phosphoreszenz ist. PSL
- 20 verwendet eine Substanz, welche die Energie einer ursprünglichen Stimulation, beispielsweise die Energie eines Photons, das von einem radioaktiv zerfallenden Atom emittiert wird, in den Elektronenorbitalen von Atomen des Phosphors speichert. Diese Energie wird als Licht emittiert, wenn der Phosphor durch Licht mit einer größeren Wellenlänge als die
- 25 der ersten Stimulation stimuliert wird. Auf diese Weise speichert der Phosphor Information über die Menge an Strahlung, der er ausgesetzt war, und gibt diese Information als Licht ab, das in einem geeigneten Gerät, wie einem im Handel erhältlichen Phosphorimager, quantitativ analysiert werden kann.

30

Die Bestrahlung von Proben im Phosphorimager wird in ähnlicher Weise durchgeführt wie die Belichtung eines Photofilms. Die bestrahlte

Phosphorimager-IP wird während der Beförderung, mit einem fokussierten Laserstrahl abgetastet (beispielsweise einem He-Ne-Laser). Die bei Bestrahlung der Phosphorkristalle mit dem Laserlicht freigesetzte PSL wird in einem Photomultiplierrohr (PMT, photomultiplier tube) durch einen Lichtsammelleiter gesammelt und in elektrische Signale umgewandelt.

Von den Typen radioaktiver Messgeräte wie sie oben diskutiert wurden (Phosphorimagers, PPAC-Ionisationsgaskammerdetektoren, Szintillationskristallarrayimager mit einem räumlich auflösenden Photomultiplier, durch eine CCD-Kamera abgebildete Szintillatorfläche), können Szintillationskristallarrayimager verschiedene Isotope unter Verwendung von Energie und Partikeltyp (beta/gamma) durch Analysieren der nachgewiesenen Impulsform verschiedener emittierter Partikel differenzieren.

PPAC-Ionisationsgaskammerdetektoren (z. B. Beta Imager) und von einer CCD-Kamera abgebildete Szintillationsflächen (z. B. Micro Imager) erfordern den Nachweis der äußerst schwachen Betapartikel von H-3 zusätzlich zu einem anderen Isotop, um verschiedene Radioisotope zu unterscheiden, wie es der Hersteller in seiner Beschreibung angibt. Diese Detektoren können mit H-3 markierte Proteine nicht direkt aus einem 2D-PAGE-Gel nachweisen, weil die Polyacrylamidmatrix die schwachen H-3 Betapartikel absorbiert. Analysatmoleküle müssen aus dem Polyacrylamidgel entfernt werden, beispielsweise durch Blotting auf eine Membran, damit sie durch PPAC-Ionisationsgaskammerdetektoren nachgewiesen werden können. Dies ist zeitaufwändig und funktioniert beispielsweise für Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht nur mit variabler Effizienz. Mit stärkeren betaemittierenden Isotopen, wie S-35, markierte Analysatmoleküle können durch Ionisationsgaskammern effizient sichtbar gemacht werden, während sie sich noch in einer Polyacrylamidgelmatrix befinden, und brauchen nicht geblottet zu werden. Szintillationskristallarrayimager, die einen räumlich auflösenden Photomultiplier verwenden und Ionisationsgaskammern belegen jedoch ein

Gerät für die gesamte Zeit der radioaktiven Bestrahlung. Deshalb sind Analysen, beispielsweise in Protein- oder Genomstudien, die einen hohen Durchsatz erfordern sehr teuer.

- 5 Nachfolgend werden weitere herkömmliche differentielle Nachweisverfahren beschrieben, die jedoch nicht zu einem differentiellen Nachweis von Analysatmolekülen auf einer Trägerfläche verwendbar sind.

10 Die quantitative Bestimmung von der in einer Materialprobe vorhandenen Konzentration von zwei unterschiedlichen Elementen unter Verwendung von zwei Messungen mit einem Detektor ist beschrieben in: Sastri et al., Anal. Chem., 1981, 53: 765-770.

15 Bei diesem Verfahren wird jedoch lediglich die Konzentration der Elemente in der Materialprobe, nicht jedoch deren Ortsverteilung, beispielsweise auf der Probenoberfläche, berechnet. Das hier beschriebene Verfahren eignet sich daher nicht zur differentiellen Analyse von Analysatmolekülen, die mit unterschiedlichen Isotopen markiert werden.

20 Die hyperspektrale Verarbeitungssoftware MultiSpec® der Purdue University (Purdue Research Foundation, West Lafayette, IN) verwendet Spektralmessungen von Bildern, um verschiedene Merkmale von Satellitenbildern zu extrahieren bzw. zu identifizieren. Das MultiSpec®-Konzept sieht vor, die spektrale Besetzung von Pixeln von einem Bild in
25 eine Reihe von Bildern zu zerlegen, die alle von einem Stammbild abgeleitet sind, für das die primären Daten alle gleichzeitig aufgezeichnet wurden. Bei diesem Verfahren werden folglich, ausgehend von einem Stammbild, verschiedenen von diesem Ursprungsbild abgeleitete Bilder durch mathematische Verfahren erzeugt.

30

David Landgrebe, Information Extraction Principles and Methods for Multispectral and Hyperspectral Image Data, Chapter 1 of Information

Processing for Remote Sensing, herausg. von C.H. Chen, veröffentlicht von der World Scientific Publishing Co., Inc, 1060 Main Street, River Edge, NJ 07661, USA, 2000.

- 5 Da die radioaktive Markierung von Analysatmolekülen oft das Mittel der Wahl ist, um die in vielen Untersuchungen, beispielsweise biologischen Untersuchungen, erforderliche analytische Leistung zu erreichen, und da der differentielle Nachweis von Analysatmolekülen aus zwei oder mehr Proben in einer Analyse wünschenswert ist, besteht ein großer Bedarf
- 10 einen derartigen differentiellen Nachweis mit radioaktiv markierten Analysaten oder anderen Molekülen durchzuführen.

Aufgabe und Lösung

15

Aufgabe der Erfindung ist es daher eine Verfahren bereitzustellen, welches differentielle Analysen, beispielsweise in Protein- oder Genomstudien, mit hoher analytischer Leistung und hohem Durchsatz bei vergleichsweise geringen Kosten ermöglicht und die beschriebenen

20 Nachteile des Standes der Technik überwinden hilft.

- Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1. Bevorzugte Weiterbildungen der Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 19 aufgeführt. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung
- 25 gemacht.

- Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Ortsverteilung von mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten mit jeweils mengen-
- 30 spezifischem Strahlungstyp auf einer gemeinsamen Trägerfläche mit folgenden Schritten bestimmt: a) Ermitteln einer ersten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche, b) Verändern der Strahlungs-

intensität mindestens eines mengenspezifischen Strahlungstyps mit einem zugehörigen Veränderungsfaktor, c) Ermitteln mindestens einer zweiten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche und d) Berechnung der Ortsverteilungen jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln aus der ersten und der mindestens zweiten ermittelten Ortsverteilung.

Unter Ortsverteilung von Punktstrahlungsobjekten ist beispielsweise die Strahlungsintensität und/oder die Anzahl der jeweiligen Punktstrahlungsobjekte pro Flächeneinheit über dem Ort bzw. über der zu untersuchenden Trägerfläche zu verstehen. Es werden die Ortsverteilungen von mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten mit jeweils mengenspezifischem Strahlungstyp untersucht. Ein Punktstrahlungsobjekt ist ein Objekt, beispielsweise ein Atom bzw. dessen Isotop und/oder ein Molekül bestehend aus Gruppen von Atomen bzw. Isotopen, das seine spezifische Strahlung nach allen Seiten, d.h. über den Raumwinkel, gleichmäßig oder zumindest idealisiert gleichmäßig abgibt. Bei dem mengenspezifischen Strahlungstyp kann es sich beispielsweise um Alpha-, Beta-, Gamma- und/oder Röntgenstrahlung und/oder um Licht mit einer spezifischen Wellenlänge handeln. Die mindestens zwei Mengen bestehen jeweils aus Punktstrahlungsobjekten mit gleichem, mengenspezifischen Strahlungstyp und befinden sich gemeinsamen auf der Trägerfläche. Die Trägerfläche ist ein im wesentlichen flächiges Gebilde, beispielsweise ein 2D-PAGE-Gel.

25

In dem ersten Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird eine erste Ortsverteilung der Strahlungsintensität, d.h. die Strahlungsleistung pro Flächeneinheit, der Trägerfläche ermittelt.

30 In dem zweiten Schritt b) wird die Strahlungsintensität mindestens eines mengenspezifischen Strahlungstyps mit einem zugehörigen Veränderungsfaktor, der bekannt ist oder bestimmt bzw. berechnet werden kann,

verändert. Die Veränderung kann eine Reduktion oder eine Verstärkung der Intensität des mengenspezifischen Strahlungstyps sein. Der Veränderungsfaktor wird in % angegeben, wobei 0% eine vollständige Unterdrückung der Strahlungsintensität, 100% ein Gleichbleiben der Strahlungsintensität und Werte größer als 100% eine Verstärkung der Strahlungsintensität bedeuten.

Es können alle Intensitäten der mengenspezifischen Strahlungstypen, nur ein Teil der Intensitäten der Strahlungstypen oder nur eine Intensität eines Strahlungstyp durch einem zugehörigen Veränderungsfaktor verändert werden. Das Verhältnis bzw. die Verhältnisse der Veränderungsfaktoren der mengenspezifischen Strahlungstypen weist bzw. weisen vorzugsweise einen Wert bzw. Werte ungleich 1 auf, d.h. die Veränderungsfaktoren der mengenspezifischen Strahlungstypen unterscheiden sich vorteilhafterweise untereinander.

In einem weiteren Schritt c) wird nach der Veränderung der Strahlungsintensitäten mindestens eine zweite Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche ermittelt.

In einem vierten Schritt d) werden die Ortsverteilungen jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln aus der ersten und der mindestens zweiten ermittelten Ortsverteilung berechnet.

Durch die Berechnung wird auf Basis der ermittelten mindestens zwei Ortsverteilungen die Ortsverteilung jeder Menge von Punktstrahlungsobjekten auf der Trägerfläche separat ermittelt, unabhängig von der Verteilung der anderen Mengen von Punktstrahlungsobjekten auf der Trägerfläche. Die Auftrennung in die mengenspezifischen Ortsverteilungen erfolgt nicht bereits durch den Detektor, sondern erst durch Berechnung auf Basis der ermittelten Ortsverteilungen, die eine Überlagerung der detektierten Signale der einzelnen Strahlungsquellen darstellen.

In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung wird der Veränderungsschritt b) und der Schritt c) zur Ermittlung der mindestens zweiten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche mit einem unterschiedlichen Veränderungsfaktor mindestens einmal wiederholt. Dies ist notwendig, wenn mehr als zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten analysiert werden sollen, da zur Bestimmung der einzelnen Ortsverteilung einer Menge mindestens eine Ortsverteilung bei zugehöriger Veränderung der Intensität des mengenspezifischen Strahlungstyps ermittelt werden muss.

Werden nur zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten analysiert, kann durch eine derartige Wiederholung die Genauigkeit des Verfahrens verbessert werden. Dies wird insbesondere dadurch erreicht, dass die Veränderungsfaktoren durch unterschiedliche Mechanismen, beispielsweise mit Hilfe eines Absorbers und/oder nachfolgend durch radioaktiven Zerfall, realisiert werden.

In einer weiteren vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung wird eine ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität durch eine zugehörige Pixelmatrix dargestellt, wobei ein Pixelwert der Matrix die Strahlungsintensität eines zugehörigen Orts auf der Trägerfläche repräsentiert.

Bei der Ermittlung der Ortsverteilungen der Strahlungsintensität der Trägerfläche, beispielsweise mit einem geeigneten ortsauflösenden Detektor, wird die Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche in eine Matrixanordnung von Pixelwerten umgesetzt, wobei die Pixelwerte proportional zu der vom Detektor ermittelten Strahlungsintensität sein können. Jedes Pixel wird einer definierten Region der Fläche zugeordnet.

In einer weiteren vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung wird die Ortsverteilung jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln auf Basis der Pixelmatrizen bestimmt.

- 5 Bei einem rein illustrativen Beispiel kann die Berechnung, bei einer Analyse von zwei Mengen A und B von Punktstrahlungsobjekten und einem Veränderungsfaktor von 0%, d.h. einer vollständigen Unterdrückung, für den Strahlungstyp der Menge A und einem Veränderungsfaktor von 100%, d.h. einem Gleichbleiben, für den Strahlungstyp der Menge B, wie folgt durchgeführt werden.

- 10 Durch die vollständige Unterdrückung des Strahlungstyps A in der zweiten ermittelten Ortsverteilung erhält man direkt die überlagerungsfreie Ortsverteilung für den Strahlungstyp B. Durch Subtraktion der zweiten ermittelten Ortsverteilung, bei der nur Signalanteile des Strahlungstyps der Menge B vorhanden sind, von der ersten ermittelten Ortsverteilung, bei der beide Signalanteile vorhanden sind, erhält man die Ortsverteilung des Strahlungstyps der Menge A ohne Signalanteile des Strahlungstyps B.

20

- Das genannte Verfahren ermöglicht, unter Verwendung desselben bzw. eines gleichartigen Detektors, eine Multicolourmessung, d.h. eine getrennte, überlagerungsfreie Darstellung der Ortsverteilung der einzelnen Punktstrahlungsquellen, ermöglicht. Herkömmliche Verfahren erfordern für eine Multicolourdarstellung die originalen Einfarbenbilder von Analy-
- 25 satmolekülen von jeder Probe. Bei der vorliegenden Erfindung werden die Einfarbenbilder jedes Isotops niemals als solche gemessen, sondern werden aus den mindestens zwei ermittelten Ortsverteilungen bzw. Bildern berechnet.

30

In der Praxis werden die den unterschiedlichen Strahlungstypen zuzurechnenden Signalkomponenten vorteilhafterweise um einen Faktor von

weniger als 100 % oder 95 % verändert bzw. reduziert. Eine Möglichkeit zur Berechnung der überlagerungsfreien Ortsverteilung der beiden Mengen von Punktstrahlungsobjekten wird nachfolgend ausgeführt.

- 5 Für einen exemplarischen Pixelwert der Pixelmatrix der ersten ermittelten Ortsverteilung gilt:

$$A + B = X \quad (1)$$

Für den Pixelwert der zweiten ermittelten Ortsverteilung gilt:

10 $MA + NB = Y \quad (2):$

Wobei

A = der Signalbeitrag des Strahlungstyps A in der ersten ermittelten Ortsverteilung

15 B = der Signalbeitrag des Strahlungstyps B in der ersten ermittelten Ortsverteilung

X = Pixelwert entsprechend der Strahlungsintensität in der ersten ermittelten Ortsverteilung

20 Y = Pixelwert entsprechend der Strahlungsintensität in der zweiten ermittelten Ortsverteilung

M = Veränderungsfaktor für den mengenspezifischen Strahlungstyp A

N = Veränderungsfaktor für den mengenspezifischen Strahlungstyp B

25

A und B sind unbekannt und gesucht.

X und Y sind die gemessenen Intensitäten.

M und N können durch Kalibrierung oder Berechnung bestimmt werden.

- 30 Das Verhältnis der Veränderungsfaktoren zweier Strahlungstypen ist definiert als das Verhältnis des Veränderungsfaktors des Strahlungstyps mit dem kleineren Veränderungsfaktor und dem des Strahlungstyps mit

dem grösseren Veränderungsfaktor (M/N mit $N \geq M$). Entsprechend werden die Verhältnisse der Veränderungsfaktoren bei mehr als zwei Strahlungstypen definiert.

5 Durch Lösen des Gleichungssystems bestehend aus den Gleichungen (1) und (2) können die Werte für A und B berechnet werden. Diese Berechnung kann analog für alle Pixel der Pixelmatrix durchgeführt werden.

10 Ist die Strahlungsintensität bzw. der Signalbeitrag eines Strahlungstyps an einem Ort bekannt, kann dadurch auch die Anzahl der Punktstrahlungsobjekte pro Flächeneinheit an dem Ort berechnet werden, da die Strahlungsintensität und die Anzahl der Punktstrahlungsobjekt pro Flächeneinheit zueinander proportional sind.

15

In einem allgemeineren Fall mit einer Anzahl P von Mengen von Punktstrahlungsobjekten, bei dem es notwendig ist, P Ortsverteilungen zu ermitteln, kann das Problem unter Verwendung einer Matrixdarstellung formuliert werden:

20

$$F * X = I$$

wobei:

25

X = ein Vektor mit P Elementen, bestehend aus den Signalbeiträgen der Strahlungstypen der P Mengen von Punktstrahlungsobjekten in der ersten ermittelten Ortsverteilung

I = ein Vektor mit P Elementen, bestehend aus den Pixelwerten der P ermittelten Ortsverteilungen

30

F = eine Matrix mit $P \times P$ Elementen, bestehend aus den $P \times P$ Veränderungsfaktoren, die für die P ermittelten Ortsverteilungen für die P verschiedenen Mengen von Punktstrahlungsobjekten berechnet oder bestimmt wurden.

Die einzelnen Signalbeiträge der Strahlungstypen des Vektors X können durch Inversion der Matrix F gemäss folgender Gleichung berechnet werden:

5

$$X = F^{-1} * I$$

10

In einer Weiterbildung der Erfindung wird die Ortsverteilung jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln auf Basis von Intensitäten bestimmt, die sich durch die Summation von Pixelwerten definierter, insbesondere benachbarter, Elemente der Pixelmatrix ergeben. Anstatt den Algorithmus wie oben beschrieben für eine pixelweise Analyse zu verwenden, können auch die aufsummierten Pixelintensitäten bestimmter Bereiche verwendet werden, die für die erste und die zweite ermittelte Ortsverteilung errechnet werden können. Dies ist besonders bei stark verrauschten Signalen oder in solchen Fällen empfehlenswert, bei denen die räumliche Verteilung der Signale auf dem Detektor für die verschiedenen Mengen von Punktstrahlungsobjekten veränderlich ist.

20

Vorzugsweise werden mehr Messungen der Ortsverteilungen unter veränderten Bedingungen durchgeführt als minimal notwendig wären. In diesem Fall wird ein Optimierungsprozess verwendet, um die einzelnen Ortsverteilungen der Punktstrahlungsobjekte zu bestimmen. Hierdurch kann die Genauigkeit der Methode verbessert werden.

25

In einer Weiterbildung der Erfindung besteht eine Menge von Punktstrahlungsobjekten aus mindestens einem strahlenden, insbesondere radioaktiv strahlenden, Typ von Isotopen. Als Isotope können beispielsweise I-125 und/oder I-131 verwendet werden.

30

In einer Weiterbildung der Erfindung besteht eine Menge von Punktstrahlungsobjekten aus lichtemittierenden, insbesondere fluoreszierenden, phosphoreszierenden und/oder lumineszierenden, Substanzen.

- 5 In einer Weiterbildung der Erfindung ist für mindestens eine Menge unterschiedlicher Punktstrahlungsobjekte an mindestens einem Ort auf der Trägerfläche mindestens ein Kalibrierungspunkt mit bekannter Strahlung vorhanden. Die Kalibrierung dient der Bestimmung bzw. der Berechnung der jeweiligen Veränderungsfaktoren, die zur Berechnung der gesuchten
10 einzelnen Ortsverteilungen benötigt werden.

- Eine Kalibrierungspunkt kann eine einzelne Signalquelle sein, beispielsweise ein einzelnes radioaktives Isotop. Die Kalibrierung dient hier dem Zweck, den absoluten oder relativen Prozentanteil der Veränderung
15 bzw. Reduktion von Signalintensitäten zu berechnen, die von den untersuchten Strahlungsquellen bzw. Isotopen herrühren.

- Die Kalibrierung kann durch Einbringen eines radioaktiven Ausgangsstoffes für eines oder mehrere der untersuchten Isotope in der Messung
20 durchgeführt werden. Das von diesem Kalibrierungsstoff gemessene Signal sollte bevorzugt keine bzw. vernachlässigbare Anteile von allen anderen radioaktiven Quellen außerhalb des Kalibrierungsstoffes enthalten. Bevorzugt ist die spezifische Aktivität des Kalibrierungsstoffes vor der Messung bekannt. Bevorzugt ist der Kalibrierungsstoff für alle unter
25 suchten Isotope verfügbar. Eine Kalibrierung ist auch unter Verwendung einer oder mehrerer radioaktiver Stoffe möglich, die räumlich gemeinsam lokalisiert, bekannte Mengen aller zu messenden Isotope enthalten. In diesem Fall müssen die spezifischen Aktivitäten bzw. Strahlungsin-
30 tensitäten jedes Isotops im Kalibrierungsstoff bekannt sein. Mit Hilfe geeigneter Algorithmen ist es auf Basis von mehreren ermittelten Ortsverteilungen möglich, den Beitrag jedes Isotops zum jeweiligen Pixelwert der Ortsverteilung zu berechnen, wobei in einer Ortsverteilung eine oder

mehrere Strahlungsintensitäten der Isotope im Signal verändert werden. Offensichtlich müssen im letzteren Fall andere Faktoren bekannt sein, beispielsweise der differentielle Grad des radioaktiven Zerfalls etc..

- 5 Wenn ein Absorber verwendet wird, hängen die Veränderungsfaktoren vom Absorbermaterial, seiner Dicke und seinem Massenabsorptionskoeffizienten für die Arten von absorbierten radioaktiven Partikeln ab. Wenn differentielle Bilder produziert werden, indem beide Isotopen zerfallen, können die Veränderungsfaktoren durch Messen der relativen
- 10 Intensitäten der Kalibrierungssubstanzen für beide Isotope bestimmt werden. Oder sie können unter Verwendung von Informationen bezüglich der exakten Zeit und Dauer jeder Bestrahlung und der Zerfallsratenkonstanten für jedes Radioisotop berechnet werden.
- 15 In einer Weiterbildung der Erfindung liegt das Verhältnis der Veränderungsfaktoren der mengenspezifischen Strahlungstypen zwischen 5% bis 90%, vorzugsweise zwischen 10% bis 70%, insbesondere zwischen 15% und 50%. Durch die Möglichkeit mit Veränderungsfaktoren zu arbeiten, die einen Strahlungstyp nicht vollständig unterdrücken, steigt die
- 20 Zahl der verwendbaren Strahlungsquellen bzw. Detektoren deutlich an. Insbesondere bei einer Realisierung der Veränderungsfaktoren durch radioaktiven Zerfall von unterschiedlich strahlenden Isotopen besteht die Möglichkeit, auch ohne vollständigen Zerfall eines Isotopentyps, die getrennten Ortsverteilungen der Isotope zu berechnen.
- 25 In einer Weiterbildung der Erfindung wird der Veränderungsfaktor durch Verwendung mindestens eines Absorbers realisiert. Ein Absorber reduziert die Intensität der durch das Material hindurchtretenden Strahlung (Partikel oder Photonen). Der Absorber kann aus Metall, Metalllegierung,
- 30 Kunststoff, Plexiglas, Teflon und/oder einem anderen geeigneten Material bestehen. Für die Funktion der Erfindung ist es wesentlich, dass die emittierten Strahlungstypen, beispielsweise Photonen von I-

125-Isotopen und Beta-Partikel von I-131-Isotopen, die das Signal auf dem Detektor erzeugen, vom Absorber mit unterschiedlichen Veränderungsfaktoren bzw. Reduktionsfaktoren absorbiert bzw. gedämpft werden. Zu diesem Zweck sind Absorber aus Elementen mit niedriger Atomzahl effektiver, beispielsweise Aluminiumfolie oder dünnes Plexiglas, da diese Absorber Beta-Partikel stärker absorbieren als Photonen. Des weiteren können Absorber aus einer sehr dünnen Schicht aus Elementen mit hoher Atomzahl verwendet werden, da diese Absorber Photonen stärker absorbieren als Beta-Partikel. Die Absorberdicke spielt bei der Absorptionseffizienz eine Schlüsselrolle.

In einer Weiterbildung der Erfindung wird der Veränderungsfaktor durch radioaktiven Zerfall der jeweiligen Punktstrahlungsobjekte der mindestens zwei Mengen realisiert, wobei vorzugsweise die jeweiligen Punktstrahlungsobjekte der mindestens zwei Mengen unterschiedliche Halbwertszeiten aufweisen. Die Veränderung bzw. Reduktion der Strahlungsintensität kommt hier nicht durch einen Absorber, sondern durch einen Unterschied in der Zerfallsrate der Punktstrahlungsobjekte zustande. Die Isotope I-125 und I-131 sind beispielsweise für diesen Zweck gut geeignet, da ihre Halbwertszeiten sich um einen Faktor von fast 7,5 unterscheiden. Es können jedoch für die Erfindung auch andere Isotope verwendet werden.

In einer Weiterbildung der Erfindung wird der Veränderungsfaktor durch eine unterschiedliche Empfindlichkeit eines zur Ermittlung einer Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche verwendeten Detektors für den jeweils mengenspezifischen Strahlungstyp realisiert. Die Veränderungsfaktoren der Strahlungsintensitäten der mengenspezifischen Strahlungstypen ergeben sich hierbei durch die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der verwendeten Detektoren für die von den mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten abgestrahlte Strahlung. Die unterschiedlichen Empfindlichkeiten werden vorzugsweise so gewählt,

dass das Verhältnis der Veränderungsfaktoren vorzugsweise größer als 5% ist.

5 In einer Weiterbildung der Erfindung werden die Ortsverteilungen der Strahlungsintensität mit einem ortsauflösenden Detektor für Alpha-, Beta-, Gamma- und/oder Röntgenstrahlung ermittelt.

10 In einer Weiterbildung der Erfindung werden die Ortsverteilungen der Strahlungsintensität mit einem sogenannten Phosphor-Imager-Detektor ermittelt. Der Phosphor-Imager-Detektor arbeitet vorzugsweise auf Basis von photostimulierter Lumineszenz.

15 Vorteilhafterweise enthält der Phosphor der Phosphorimager-IP zusätzlich Atome mit hoher Ordnungszahl Z , beispielsweise Blei. Werden bei der Herstellung der Phosphorimager-IP Atome mit hoher Ordnungszahl Z in die Phosphorimager-IP eingebracht, die beispielsweise in einer bleihaltigen Verbindung enthalten sind, erhöht sich dessen Nachweisempfindlichkeit für Gamma-Strahlung.

20 In einer Weiterbildung der Erfindung wird die erste und die mindestens zweite Ortsverteilung der Strahlungsintensität mit einem gleichartigen Detektor ermittelt. Prinzipiell ermöglicht ein Detektor keine klare Diskriminierung zwischen unterschiedlichen Strahlungstypen, beispielsweise Betapartikeln oder Photonen, die beispielsweise von zwei verschiedenen Isotopen stammen, oder Strahlung von Isotopen mit unterschiedli-

25 chen Halbwertszeiten. Mit Hilfe des genannten Verfahrens ist unter Verwendung desselben bzw. eines gleichartigen Detektors eine Multicolourmessung möglich, d.h. eine getrennte, überlagerungsfreie Messung der Ortsverteilung der einzelnen Typen von Punktstrahlungsquellen.

30 Gleichartige Detektoren sind hierbei Detektoren desselben Typs oder gleicher Bauart, die sich beispielsweise nicht oder nur unwesentlich in ihrer Empfindlichkeit für spezifische Strahlungstypen unterscheiden.

Dies vereinfacht den Aufbau einer Analysevorrichtung und spart somit Kosten.

In einer Weiterbildung der Erfindung werden mindestens zwei zu
5 analysierende Stoffe mit jeweils einer Menge von
Punktstrahlungsobjekten markiert, die so markierten Stoffe gemischt und
das Gemisch anschließend auf die Trägerfläche, insbesondere in Form
eines flächenartigen Analysemittels, aufgetragen. Bei den zu
analysierenden Stoffen kann es sich vorteilhafterweise um Peptide,
10 Proteine und/oder Oligonukleotide handeln, wobei beispielsweise eine
erste und eine zweite Proteinprobe, die jeweils aus einer Vielzahl
verschiedener Proteine bestehen können, mit jeweils unterschiedlichen
Isotopen markiert werden. Nach der Markierung werden die Proteine der
beiden Proben gemischt und gemeinsam auf ein Analysemittel,
15 insbesondere ein Proteingel, Nukleinsäure-Array, Protein-Array, ELISA-
Array und/oder ein Blot aufgetragen. Auf dem Analysemittel erfolgt
anschließend eine gemeinsame Auftrennung der zu analysierenden
Stoffe bzw. Proteine der unterschiedlichen Proben anhand von
spezifischen Eigenschaften, die beispielsweise durch das Analysemittel
20 bestimmt werden. Im Anschluss an die Auftrennung wird nun die Orts-
verteilung der Punktstrahlungsobjekte für jede Menge von
Punktstrahlungsobjekten einzeln durch das erfindungsgemäße Ver-
fahren berechnet. Über die Ortsverteilung der spezifischen Punktstrah-
lungsobjekte kann nun auf die Ortsverteilung der zu untersuchenden
25 Proteine der jeweiligen Proben getrennt voneinander geschlossen wer-
den.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

30 Vorteilhafte, nachfolgend beschriebene Ausführungsformen der Erfin-
dung sind in den Zeichnungen dargestellt, in denen zeigen:

Fig. 1A mit einem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität eines mit Hilfe eines 2D-Gels aufgetrennten Gemisches aus 2 Proteinproben, wobei eine Probe mit Isotopen des Typ I-125 und die andere Probe mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde,

Fig. 1B mit dem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität des 2D-Gels von Fi.1A nach einer Wartezeit von 82 Tagen,

Fig. 1C mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde,

Fig. 1D mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde,

Fig. 1E Differenz der Ortsverteilungen von Fi.1C und Fig.1D, wobei die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, blau und die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde, orange dargestellt ist,

Fig. 1F mit dem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität des 2D-Gels von Fi.1A nach einer Wartezeit von 23 Tagen,

Fig. 1G mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, wobei zur Berechnung als zweite ermittelte Ortsverteilung die Ortsverteilung von Fig. 1F verwendet wurde,

Fig. 1H mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde, wobei zur Berechnung als zweite ermittelte Ortsverteilung die Ortsverteilung von Fig. 1F verwendet wurde,

Fig. 1I Differenz der Ortsverteilungen von Fig. 1G und Fig. 1H, wobei die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, blau und die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde, orange dargestellt ist,

Fig. 2A mit einem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität von mit Isotopen des Typs I-125 und Isotopen des Typs I-131 markierten Proteinproben aus Rinderserumalbumin unterschiedlicher Verdünnungsstufen und Mischungsverhältnissen ohne Verwendung eines Absorbers,

Fig. 2B mit dem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität von Fig. 2A unter Verwendung eines Absorbers,

Fig. 2C mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Isotope des Typs I-125,

Fig. 2D mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Isotope des Typs I-131,

Fig. 2E Differenz der Ortsverteilungen von Fig. 2C und Fig. 2D, wobei die Isotope des Typs I-125 blau und die Isotope des Typs I-131 orange dargestellt sind.

Erste Ausführungsform

In einer ersten Ausführungsform der Erfindung werden zwei Proteinproben, die jeweils aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen bestehen, mit jeweils unterschiedlichen Isotopen des Elements Jod markiert. Die erste Probe wird mit I-125, die zweite Probe mit I-131 markiert. Zur Kalibrierung der Masseskala werden spezielle Massenreferenzproteine mit I-125 markiert. I-125 weist eine Halbwertszeit von 60,14 Tagen auf und zerfällt durch Elektronenfang, wodurch Röntgenstrahlen und Gammastrahlen im Bereich von 27 keV bis 35 keV entstehen. I-131 weist eine Halbwertszeit von 8,06 Tagen auf und zerfällt durch die verschieden Mechanismen der Beta-Emission.

Die Proben werden anschließend gemischt und mit Hilfe eines 2D-Gels aufgetrennt. Zur Bestimmung der Veränderungsfaktoren werden auf der linken Seite des Gels Kalibrierungspunkte für beide Isotopentypen aufgebracht. Sie dienen zur Berechnung der Veränderungsfaktoren die bei der Berechnung der einzelnen Ortsverteilungen benötigt werden.

Nach der 2-dimensionalen Auftrennung, wird die Phosphorimager-IP während einer vorbestimmten Zeit mit der Probe bzw. der Strahlung der Probe beaufschlagt. Die Phosphorimager-IP ist sowohl für energiearme Röntgenstrahlen, Gammastrahlen und Betapartikel empfindlich. Die relativ hochenergetischen Photonen des I-131 Zerfalls werden von einer Phosphorimager-IP mit nur geringer Effizienz absorbiert bzw. detektiert. Die Phosphorimager-IP integriert die Strahlungsintensitäten beider Strahlungsquellen auf. Anschließend wird die Ortsverteilung der gespeicherten Strahlungsenergie der Phosphorimager-IP mit einem Lesegerät abgelesen und in eine Pixelmatrix bzw. ein Bild abgebildet, welche in Fig. 1A gezeigt ist. Die so ermittelte Ortsverteilung bzw. die Pixelmatrix enthält Anteile, die sowohl von I-125 als auch von I-131 stammen. Nach einer Wartezeit von 82 Tagen wird die Ortsverteilung der Probe wie

oben beschrieben erneut bestimmt. Diese Ortsverteilung ist in Fig. 1B gezeigt. Aufgrund der unterschiedlichen Halbwertszeiten der beiden Isotope hat die Strahlungsintensität bzw. die Aktivität von I-125 um einen Faktor von ca. zwei abgenommen. Im Gegensatz dazu beträgt die
5 Strahlungsintensität von dem auf dem Gel verbleibendem I-131 weniger als 1 % der ursprünglichen Strahlungsintensität. In Fig. 1B sind folglich fast ausschließlich Signalanteile von I-125 vorhanden.

Die unterschiedliche Veränderung der Strahlungsintensitäten wird in
10 dieser Ausführungsform ausschließlich durch die inhärenten Eigenschaften des unterschiedlichen radioaktiven Zerfalls der beiden Isotope, nicht jedoch durch einen Absorber bewirkt.

Anschließend wird anhand des erfindungsgemäßen Verfahrens die
15 Ortsverteilung der einzelnen Isotope getrennt berechnet. Zur Berechnung wurde die Intensität über einen Bereich von 4X4 benachbarten Pixeln herangezogen bzw. summiert, wobei ein Gauss-Filter verwendet wurde. Die Ausrichtung der ermittelten Ortsverteilungen zueinander erfolgt anhand von entsprechenden Referenzpunkten, die an jeweils gleichen
20 Orten der Ortsverteilung vorhanden sind. Fig. 1C zeigt die berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität bzw. der Isotopenmenge der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde und Fig. 1D zeigt die berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde. Fig. 1E
25 zeigt die Differenz der Ortsverteilungen von Fig. 1 C und Fig. 1 D, wobei die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, blau und die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde, orange dargestellt sind. Schwarz bedeutet, dass eine gleiche Anzahl beider Isotope vorhanden ist.

30

Die Ortsverteilung der Strahlungsintensität kann selbstverständlich auch ohne einen ortsauflösenden Detektor bestimmt werden. Hierzu wird die

zu untersuchende Trägerfläche durch geeignetes Auftrennen, beispielsweise Zerschneiden, in kleinere Stücke zerteilt und die Strahlungsintensität dieser Stücke durch einen herkömmlichen "Single-Source"-Detektor bestimmt. Die Bestimmung des Strahlungstyps und der Strahlungsintensität kann beispielsweise unter Verwendung von Gamma- und/oder Beta-Spektroskopie erfolgen.

Zweite Ausführungsform

10

In einer zweiten Ausführungsform der Erfindung, wird bei gleicher Vorgehensweise wie in der ersten Ausführungsform die Wartezeit zwischen der Ermittlung der ersten und der zweiten Ortsverteilung von 82 Tagen auf 23 Tage reduziert. Fig. 1F zeigt die mit dem Phosphorimager ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität des 2D-Gels von Fig.1 A nach einer Wartezeit von 23 Tagen. Durch den noch nicht vollständigen Zerfall von I-131 tragen nun beide Isotope zu der ermittelten Ortsverteilung bei. Die Veränderungsfaktoren sind folglich für beide Isotope wesentlich größer als 0 %. Gleichermassen ist das Verhältnis der Veränderungsfaktoren wesentlich größer als 0%.

Fig. 1G zeigt die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahren berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, Fig. 1H zeigt die analog berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurde, wobei zur Berechnung in beiden Fällen als zweite ermittelte Ortsverteilung die Ortsverteilung von Fig. 1F verwendet wurde.

Fig. 1I zeigt die Differenz der Ortsverteilungen von Fig.1G und Fig.1H, wobei die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurde, blau und die Proteinprobe, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert

wurde, orange dargestellt ist. Schwarz bedeutet, dass eine gleiche Anzahl beider Isotope vorhanden ist.

Die Ergebnisse dieser Ausführungsform decken sich mit den Ergebnissen der Ausführungsform 1, die aufgrund der fast vollständigen Unterdrückung von I-131 als Referenzergebnisse dienen können. Das erfindungsgemäße Verfahren liefert folglich zuverlässige Messergebnisse selbst dann, wenn bei der Ermittlung der zweiten Ortsverteilung ein Strahlungstyp nicht vollständig unterdrückt ist.

10

Dritte Ausführungsform

In dieser Ausführungsform der Erfindung wird ein Absorber verwendet, um die entsprechenden Veränderungsfaktoren zu realisieren, d.h. um differentielle Messungen der die zwei Isotope I-125 und I-131 enthaltenen Probe vorzunehmen. Es wird analog zur ersten Ausführungsform der Erfindung ein zweidimensionales Gel hergestellt, das die mit den zwei Isotopen I-125 und I-131 markierten Proteine enthält. Die Phosphorimager-IP wird während einer vorbestimmten Zeit der Ortsverteilung der Strahlungsintensität des 2D-Gels ausgesetzt. Anschließend wird die Phosphorimager-IP durch das Phosphorimagerauslesegerät abgelesen. Die Strahlungsintensität über der Fläche des 2D-Gels wird in einer Matrix abgebildet, wobei die Werte der einzelnen Elemente der Matrix bzw. der Pixel die Strahlungsintensität des zugeordneten Bereichs auf der Phosphorimager-IP abbilden. Es entsteht eine Matrix bzw. ein Bild, dessen Signalanteile sowohl von I-125 als auch von I-131 herrühren.

Um die Signalanteile zu separieren ist es notwendig, die Intensität eines Strahlungstyps durch geeignete Mittel zu verändern bzw. zu reduzieren und ein zweites Bild bzw. eine zweite Ortsverteilung zu ermitteln.

Durch Einbringen eines Absorbers bekannter Dicke zwischen die Probe und die Phosphorimager-IP während der Bestrahlung kann die Strahlungsintensität selektiv für jeden Strahlungstyp mit unterschiedlichen Veränderungsfaktoren reduziert werden. Ein derartiger Absorber kann
5 aus Metall, Metalllegierung, Kunststoff, Plexiglas, Teflon oder einem anderen geeigneten Material bestehen. Der Absorber muss, um die erfindungsgemäße Funktion zu erzielen, den von den Strahlungsquellen emittierten Strahlungstyp (in dieser Ausführungsform Photonen von I-125 und Beta-Partikel von I-131), der das Signal auf dem Detektor erzeugt,
10 mit jeweils unterschiedlichen Veränderungsfaktoren absorbieren.

Bei dieser Ausführungsform kann mit Hilfe des Absorbers die Intensität des von I-131 stammenden Signals relativ zum Signal von I-125 signifikant verringert werden. Zu diesem Zweck sind Absorber aus Elementen
15 mit niedriger Atomzahl effektiver (Beispiel: Aluminiumfolie, dünnes Plexiglas usw.). Die Absorberdicke spielt bei der Absorptionseffizienz eine Schlüsselrolle.

Das Ermitteln der ersten und der mindestens zweiten Ortsverteilung der
20 Strahlungsintensität kann mit Hilfe einer "sandwichartigen" Anordnung aus Phosphorimager-IP, Gel, Absorber, Phosphorimager-IP gleichzeitig erfolgen. Alternativ könnten die Bilder nacheinander, mit oder ohne Absorber gemacht werden, was bei der Erfindung bevorzugt wird. Offensichtlich können auch andere radioaktive Isotope für die hier offenbarte
25 Erfindung verwendet werden.

Vierte Ausführungsform

30 In einer vierten Ausführungsform der Erfindung wird, wie in der dritten Ausführungsform, ein Absorber verwendet, um die Strahlungsintensität der unterschiedlichen Strahlungstypen unterschiedlich zu verändern.

In dieser Ausführungsform werden zwei Proben aus Rinderserumalbumin einmal mit I-125 und einmal mit I-131 markiert. Die Proben werden jeweils vier Mal in 10-er-Stufen verdünnt. Es entstehen also von jeder

5 Probe jeweils 5 Verdünnungsstufen, von unverdünnt bis auf 1/10000 verdünnt. Die Strahlungsintensitäten unterscheiden sich folglich um den Faktor 10000. Jede Verdünnungsstufe der ersten Probe wird mit jeder Verdünnungsstufe der zweiten Probe gemischt. Es entstehen so insgesamt 25 Proben mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen, die je-

10 weils in einem Volumen von 1 µl auf ein quadratisches Filterpapier von 3mm Seitenlänge aufgetragen werden. Die Filterpapiere werden in einer Matrixanordnung auf einem flächigen Träger angeordnet. Die Konzentration von I-125 nimmt von unten nach oben ab. Die Konzentration von I-131 nimmt von links nach rechts ab.

15

Eine Phosphorimager-IP wird während 24 Stunden mit der Strahlung des flächigen Trägers beaufschlagt. Die Phosphorimager-IP integriert die Strahlungsintensitäten beider Strahlungsquellen der Proben auf. Anschließend wird die Ortsverteilung der gespeicherten Strahlungsenergie

20 der Phosphorimager-IP mit einem Lesegerät abgelesen und in eine Pixelmatrix bzw. ein Bild abgebildet, welche in Fig. 2A gezeigt ist. Die so ermittelte Ortsverteilung bzw. die Pixelmatrix enthält Anteile, die sowohl von I-125 als auch von I-131 stammen. Direkt nach der Ermittlung dieser ersten Ortsverteilung wird eine zweite Ortsverteilung ermittelt, wobei ein

25 Absorber zwischen dem flächigen Träger und der Phosphorimager-IP angeordnet wird. Diese zweite Ortsverteilung ist in Fig. 2B gezeigt. Der Absorber besteht aus einer 900 µm dicken Plastiksicht. Die Strahlungsintensitäten der auf dem flächigen Träger angeordneten Proben wurden für beide ermittelten Ortsverteilungen unter Verwendung der

30 gleichen Bereiche aufintegriert bzw. aufsummiert. Auf Basis dieser integrierten Strahlungsintensitäten wird aus den beiden ermittelten Ortsverteilungen mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens die Ortsvertei-

lung der einzelnen Isotope getrennt berechnet. Fig. 2C zeigt die berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität bzw. der Isotopenmenge der Proteinproben, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurden und Fig. 2D zeigt die berechnete Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Proteinproben, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurden. Fig. 2E zeigt die Differenz der Ortsverteilungen von Fig. 2C und Fig. 2D, wobei die Proteinproben, die mit Isotopen des Typs I-125 markiert wurden, blau und die Proteinproben, die mit Isotopen des Typs I-131 markiert wurden, orange dargestellt sind. Schwarz bedeutet, dass eine gleiche Anzahl beider Isotope vorhanden ist.

Die unverdünnte, mit I-125 markierte Probe unten rechts und die unverdünnte, mit I-131 markierte Probe oben links wurden verwendet, um die Zerfallskonstanten zu berechnen, die zur Berechnung der Ortsverteilungen benötigt werden.

Das berechnete Ergebnis stimmt in engen Fehlergrenzen mit dem theoretisch zu erwartenden Ergebnis überein. Dies zeigt, dass das erfindungsgemäße Verfahren auch bei Veränderungsfaktoren, die deutlich über 0% liegen, funktioniert.

Mögliche Variationen der Ausführungsformen

Bei den obigen Ausführungsformen der Erfindung werden Analysatmoleküle (Proteine) mit chemisch identischen Radioisotopen (radioaktivem Iod) markiert. Dieses Verfahren ist äußerst nützlich zur Durchführung differentieller Analysen, weil die Unterschiede der Intensitätsverteilung der Strahlung zwischen den beiden Proben durch Unterschiede zwischen den Proben selbst bedingt sind. Dies gilt auch für beispielsweise mit P-33 und P-32 markierte Proteine.

Mit einer Kombination von mit C-14, S-35 oder P-33 markierte Proteine erzeugen unterschiedliche 2D-PAGE-Bilder, weil Kohlenstoff, Schwefel und Phosphat jeweils in unterschiedlicher Chemie in den Proteinen vorhanden ist. So haben einige Proteine kein Cystein oder Methionin und tragen deshalb keinen Schwefel, und werden doch durch eine Kinase phosphoryliert, so dass sie effizient Phosphat tragen. Andere Proteine können viele schwefelhaltige Aminosäuren aufweisen, und doch nicht phosphoryliert werden. Trotzdem ist die vorliegende Erfindung auch geeignet, die synthetischen Bilder zu extrahieren, die der Verteilung beider Isotopen entsprechen, wenn eine Kombination dieser Isotopen erfindungsgemäß verwendet wird. Tatsächlich ist die Erfindung auf die differentielle Messung jeglicher Radioisotope anwendbar, die auf einer Oberfläche oder einer ähnlichen Fläche verteilt sind, auch solche mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen, die für Phosphorimageranalyse geeignet sind.

Die für die Erfindung geeigneten radioaktiven Isotope weisen signifikante Unterschiede in der Zerfallsrate, der Energie emittierter Partikel, der Art der emittierten Partikel oder einer Kombination davon auf. Eine hohe Isotopenreinheit ist wünschenswert, aber nicht notwendig.

Eine hohe chemische Reinheit der Radioisotope ist wünschenswert, aber nicht notwendig. Es ist möglich, die Erfindung auf Proben anzuwenden, die mit verschiedenen Mischungen von Isotopen markiert sind, wie z.B. die Markierung einer Probe mit 95 % I-131, 5 % I-125 und Markierung der anderen Probe mit 5 % I-131, 95 % I-125. Die Markierungsmischung kann offensichtlich recht komplex sein, ohne von der Idee oder dem Rahmen der Erfindung abzuweichen, und könnte beispielsweise Spuren Mengen vieler Isotope enthalten, von denen einige nicht kovalent in die Analysatmoleküle eingebracht werden, wie K-40.

Die vorliegende Erfindung ist unabhängig vom Verfahren des Einbringens radioaktiver Isotope in die Analysatmoleküle. Beispielsweise können Proteine durch metabolische Aufnahme, durch Radioiodation postharvest, durch Alkylierung mit radioaktiven Reagenzien (jeglicher Chemie) oder durch andere Verfahren markiert werden.

Eine andere Anwendung von Phosphorimagern ist die Messung von DNA und Nukleinsäurearrays. In solchen Anwendungen, wie der Häufigkeitsanalyse von mRNA, können P-33, P-32, S-35, C-14, H-3 und andere Isotope alle auf herkömmliche Art in Hybridisierungsmoleküle eingebracht werden. Durch die Prinzipien der Erfindung kann ein Phosphorimager verwendet werden, um Zweifarbenanalysen dieser Systeme durchzuführen. Wegen der einfachen Chemie von DNA-artigen Polymeren, können die Strahlungsintensitäten von Hybridisierungsmolekülen, die diese Radioisotope enthalten, alle identisch sein, wenn dieselbe Probe unabhängig markiert und für jedes Isotop gemessen wird. Die oben beschriebenen Prinzipien gelten offensichtlich auch für Proteinarrays oder alle anderen Arrays oder semiplanaren Verteilungen von Analysatmolekülen, die für Phosphorimageranalyse geeignet sind.

Es ist erkennbar, dass Anwendungen der Erfindung im Bereich der medizinischen Bildgebung implementiert werden können, wo zwei oder mehr differentielle Bilder erzeugt werden, um synthetische Bilder von zwei oder mehr Signalquellen zu extrahieren. Ein Beispiel könnte den Nachweis gewisser radioaktiver Spurenelemente kombiniert mit Röntgen des Körpers unter Verwendung geeigneter Absorber gemäss der Erfindung betreffen, und im Bereich der Medizin von großem Vorteil sein.

Offensichtlich ist die vorliegende Erfindung nicht auf Phosphorimager-IP und nicht auf radioaktive Messungen beschränkt. Die Erfindung kann auch auf Fälle angewendet werden, bei denen sichtbares Licht und nicht Radioaktivität mehrfach gemessen wird und beide Signalanteile algo-

rithmisch extrahiert werden. Beispielsweise kann eine Enzymreaktion Licht ähnlicher Wellenlänge produzieren wie jenes, das von einem fluorophoren oder lumineszenten Molekül emittiert wird. Indem die Intensitätsverteilung des Lichts ermittelt wird, das durch die chemische Reaktion und das Fluorophor gemeinsam emittiert wird, und die Intensitätsverteilung des Lichts, das durch das Fluorophor emittiert wird, nachdem die enzymatische Reaktion eine reduzierte Lichtmenge produziert, können die Beiträge des fluoreszent und enzymatisch produzierten Lichts im ursprünglichen Bild bestimmt werden. Bei dieser Implementierung ist wichtig, dass die Reduktion der Intensität beider Lichtquellen bekannt ist oder genau kalibriert werden kann.

Alle in dieser Offenbarung zitierten Publikationen und Patentanmeldungen werden durch Bezugnahme zum Bestandteil der Offenbarung der Erfindung gemacht.

Terminologie, Material und Methoden

Nachfolgend wird die verwendete Terminologie erläutert und eine Übersicht über die herkömmlichen Materialien und Methoden gegeben.

Ein Bild wird durch eine Matrix dargestellt, wobei die Matrixzellenwerte beispielsweise der Intensität eines Signals entsprechen, das durch einen Detektor an einem entsprechenden Ort auf der abgebildeten Oberfläche erfasst wird. Die Bilder können in den üblichen Dateiformaten für Bilder gespeichert werden.

Unter einer Mehrfarbenanalyse ist zu verstehen, dass mehrere Proben jeweils separat markiert, vermischt und gemeinsam separiert werden. Die Auswertung erfolgt dann für jede Probe einzeln, unbeeinflusst von

der Existenz der jeweils anderen Proben. Es gibt verschiedene Verfahren, um Mehrfarbengleichungen zu erzeugen.

5 Genomik bedeutet die quantitative Untersuchung von Nukleinsäuren oder nukleinsäureähnlichen Polymeren.

10 Proteomik wurde definiert als die Untersuchung aller Proteine, die durch die Genome der untersuchten Zellen exprimiert werden. Das Akronym PROTEOM bedeutete PROTEine, die von einem GenOM exprimiert werden.

15 Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. Electrophoresis, 16, 1090-4.

20 Hier bedeutet Proteomik speziell die Untersuchung von Molekülen, bei denen mindestens ein Teil in ein Ribosom (ein Protein) translatiert wurde, wie es Fachleuten bekannt ist, oder eine Gruppe solcher Proteine. Proteomik umfasst auch die Untersuchung von posttranslationalen Proteinmodifikationen, Proteinsynthese und Abbauraten, Proteinabbauprodukte und Kombinationen davon.

25 Hier bezieht sich Molekularprofil oder Profil eines biologischen Systems, wie einer Zelle, einer Gruppe von Zellen, einem Gewebe oder einem Organismus, auf ein Muster von Änderungen in der Genexpression oder Proteinexpression oder Lipidzusammensetzung oder Metabolitenproduktion von kleinen Molekülen oder Temperatur oder Metabolitensekretion von kleinen Molekülen, Änderungen in Zuckerhäufigkeit oder -typen, 30 oder Änderungen in posttranslationalen Proteinmodifikationen, oder Änderungen in der Proteinproteolyse, oder Änderungen in der Ionensekretion durch ein oder mehrere Zellabteile, oder in der Ionenaufnahme

durch ein oder mehrere Zellabteile zwischen zwei oder mehr untersuchten biologischen Systemen. Allgemeiner ausgedrückt ist das Molekularprofil eines biologischen Systems ein Mass für die Atome, die dieses System bilden, und insbesondere ihrer chemischen, räumlichen und zeitlichen Beziehungen zueinander.

Array bedeutet eine geordnete Platzierung oder Anordnung. Der Begriff wird hier verwendet, um eine geordnete Platzierung von Oligonukleiden (einschliesslich RNA, cDNA und genomischer DNA) oder von Liganden für Analysatmoleküle, wie Affinitätsreagenzien für Proteine, Lipide und Zucker oder Moleküle, die solche funktionellen Gruppen enthalten (z. B. enthält ein Glycoprotein mindestens eine Zuckergruppe oder z. B. enthält ein Lipoprotein mindestens eine Lipidgruppe) zu bezeichnen. Die angeordneten Moleküle sind auf einer Oberfläche positioniert, beispielsweise einem Chip, und werden verwendet, um komplementäre Oligonukleotide einzufangen (einschliesslich RNA, cDNA und genomische DNA) oder Substrate für den Liganden. Da das Oligonukleotid oder der Ligand in jeder Position in der Anordnung bekannt ist, kann die Sequenz (einer Nukleinsäure) oder eine physikalische Eigenschaft (eines Proteins) durch die Position, in der die Nukleinsäure oder das Substrat an das Array binden, bestimmt werden.

Proteinseparationsverfahren

Die Anwendung der Elektrophorese für präparative Zwecke ist eine etablierte Technik und es gibt verschiedene Typen von Elektrophoresegeräten für präparative und analytische Zwecke. Diese Geräte und ihre begleitenden Prinzipien können in drei Kategorien eingeteilt werden.

Andrews AT. (1986) Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications. Oxford University Press.

Westermeyer R. (1977) Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. John Wiley and Sons, Weinheim.

- 5 a) Zonenelektrophorese
- b) Isotachophorese
- c) Isoelektrisches Fokussieren

10 Isotachophorese verwendet hydrophile Matrices und zeigt typischerweise hohe Auflösung, aber geringe Ladekapazitäten. In Kombination mit freier Elektrophorese kann das Verfahren für mikropräparative Zwecke angewendet werden.

Weber G, Bocek P. (1998) Stability of continuous flow electrophoresis.
15 Electrophoresis, 19, 3094-3905.

Isoelektrisches Fokussieren (IEF, isoelectric focussing) wird entweder in Flüssigkeitsdichtegradienten, in Gelgradienten oder in Mehrkammergeräten durchgeführt, mit einem Separationsgelmedium auf Basis von IEF-
20 Immobilin.

Righetti PG. (1990) Immobilized pH gradients: theory and methodology. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Bd. 20 (Hrsg. RH Burdon, PH Knippenberg). S. 397. Elsevier, Amsterdam.
25 Righetti PG, Bossi A, Wenisch E, Orsini G. (1997) Protein purification in multicomponent electrolyzers with isoelectric membranes. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 699, 105-15.

Zonenelektrophorese umfasst Glycin, Bicin und Tricin gepufferte SDS-
30 PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Proteinsysteme, die üblicherweise in der Proteinanalyse verwendet werden und in den oben genannten Literaturziten diskutiert werden.

Derzeitige Proteomiktechniken umfassen üblicherweise die Verwendung von 2D-PAGE (zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese), wodurch Proteine zunächst durch Unterschiede im pI durch IEF in der ersten Dimension getrennt werden. Diese Proteine werden dann anschließend durch das Molekulargewicht in einem SDS-PAGE-Gel in der zweiten Dimension getrennt.

Während 2D-PAGE derzeit das Verfahren ist, das die höchste Trennleistung für biochemische Reinigungen ergibt, übersteigt die Zahl der Proteine und ihrer modifizierten Isoformen, die in eukaryotischen Zellen, Geweben und Organismen vorhanden sind, die Trennkapazität des besten 2D-PAGE-Systems. Die Häufigkeiten verschiedener Proteine und Proteinisoformen in komplexen eukaryotischen Zellen, Geweben und Organismen schwankt auch stark. Die häufigsten Proteine in einer eukaryotischen Zellen können mit mehr als 10^8 Kopien pro Zelle vorhanden. Beispiele häufiger Proteine umfassen bestimmte Cytoskelettproteine oder Albumin in Leber und Blutserum. Einige Proteine können signifikante biologische Effekte ausüben, wenn sie in sehr geringen Mengen vorhanden sind, vielleicht nur mit ein paar Molekülen pro Zelle. Obwohl die geringste Menge, bei der Proteine biologische Aktivität ausüben können, kaum verstanden ist, könnte diese Kategorie Beispiele umfassen wie Telomerase und DNA-Polymerase bei der Progression von präkanzerösen bis kanzerösen Zellen. Andere Fälle, wenn Moleküle geringer Häufigkeit in Proteinmischungen biologisch relevant sind, sind im Blut, wo ein paar Moleküle Cytokin pro Liter von Bedeutung sein können oder Knochenmark, wo nur eine Metastasenkrebszelle unter Billionen anderer Zellen fatale biologische Konsequenzen für den Patienten haben kann. Zur Diskussion der Anzahl von Proteinen und Proteinisoformen, die in eukaryotischen Zellen zu erwarten sind, und einige Implikationen für 2D-PAGE in Proteomik siehe Vuong et al.

Vuong GL, Weiss SM, Kammer W, Priemer M, Vingron M, Nordheim A, Cahill MA. Improved sensitivity proteomics by post harvest alkylation and radioactive labelling of proteins. 2000, Electrophoresis 21: 2594-2605.

5

Die Reproduzierbarkeit von 2D-PAGE ist auch notorisch gering, so dass typischerweise mehrere Replikate jedes Gels erforderlich sind, um mit Softwarepaketen eine mittlere Näherung der Zusammensetzung des typischen 2D-PAGE-Musters des untersuchten Systems zusammenzustellen.

10 Es sind einige Softwarepakete im Handel erhältlich. Eine wichtige Anwendung proteomischer Studien ist, den Unterschied in der Häufigkeit bestimmter Proteine oder Proteinisoformen zwischen zwei oder mehr experimentell interessanten Regimen zu bestimmen, wie Proteinen von Kontrollzellen, Geweben oder Organismen, im Vergleich zu entsprechenden Häufigkeiten aus pharmakologisch behandelten Zellen, Geweben oder Organismen.

Eine Reihe anderer Verfahren sind zur Proteintrennung verfügbar, die ohne darauf beschränkt zu sein Hochdruckflüssigkeitschromatographie, 20 Dünnschichtchromatographie, FPLC, Gelfiltrationschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Mikrofluidsysteme wie Kapillarelektrophorese und auf Chips gestützte Mikrofluidik, Affinitätsreagenzien mit Mikroaffinitätsarrays und Elektrophorese umfassen. Die folgenden Literaturstellen beschreiben den Stand der Technik von Trennverfahren, die 25 in der Proteomikforschung eingesetzt werden.

Daniel C. Liebler: Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology. 300 Seiten 1. Aufl. (Nov. 2001) Humana Press; ISBN: 0896039927

30 Timothy Palzkill. Proteomics. 1. Aufl. (15. Nov. 2001) Kluwer Academic Publishers; ISBN 0792375653.

MJ Dunn (Hrsg.) Proteomics Reviews 2001. (April 2001) VCH Verlagsges. mbH; ISBN: 3527303146.

Andre Schrattenholz (Hrsg.). Methoden der Proteomforschung. Molekulare Analyse der Proteinexpression. 2001. Spektrum Akademische Verlag, Heidelberg. ISBN: 382741153X.

Issaq HJ. The role of separation science in proteomics research. Electrophoresis 2001, 22:3629-3638.

Figeys D, Pinto D. Proteomics on a chip: promising developments. Electrophoresis 2001, 22:208-16.

Blagoev B, Pandey A. Microarrays go live – new prospects for proteomics. Trends Biochem. Sci. 2001, 26:639-641.

10 Cahill DJ. Protein and antibody arrays and their medical applications. J Immunol Methods 2001, 250:81-91.

Pawletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Petricoin III EF, Liotta LA. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. Oncogene

15 2001, 20:1981-1989.

Figeys D, Pinto D. Proteomics on a chip: promising developments. Electrophoresis 2001, 22:208-16.

20 Miklos GL, Maleszka R. Protein functions and biological contexts. Proteomics 200, 1:169-178.

Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Molecular Cell Biology, 4. Aufl. W.H. Freeman, New York, ISBN:0-7167-3136-31986.

25 Patterson SD. Proteomics: the industrialization of protein chemistry. Curr. Opin. Biotechnol. 2000 11:413-418.

Proteinnachweis in der Proteomik

30 Proteine können durch eine Vielzahl von Verfahren nachgewiesen werden, die in den obigen Literaturstellen beschrieben sind, welche, ohne darauf beschränkt zu sein, umfassen:

- 1) Verbindung von Farbstoffen oder Anfärbemitteln wie Amidschwarz, Sulforhodamin B, Agalmaschwarz oder verschiedene Silberanfärbeverfahren (obige Literaturzitate).
- 5 2) Spektroskopischer Nachweis von aromatischen Aminosäuren oder Peptidbindungen.
- 3) Nichtkovalente Assoziation von Fluoreszenzreagenzien.
- 4) Kovalente Bindung von Fluoreszenzreagenzien, wie Monobrombimanthiolyt, Naphthalen-2,7-disulfonsäure, Fluorescein, Cyefarbstoffderivate oder eine Reihe anderer Reagenzien, die den Fachleuten bekannt sind. Das Einbringen von fluoreszierenden Gruppen in Proteinmoleküle kann z. B. durch Alkylierung von Aminogruppen wie Lysin oder der Aminoendgruppe, durch Alkylierung von Cysteingruppen oder durch andere Verfahren erreicht werden.
- 10 5) Metabolisches Einbringen von radioaktiven Isotopen, darunter H-3, C-14, S-35, P-32 und P-33 gefolgt von radioaktivem Nachweis.
- 6) Radioaktive Markierung postharvest, wie Proteiniodierung (Vuong et al, siehe oben und dort genannte Zitate), gefolgt von radioaktivem Nachweis.
- 20 7) Immunnachweis, wo Antikörper oder rekombinant produzierte Affinitätsmoleküle spezifisch mit interessierenden Proteinen in Wechselwirkung treten, nach einer Reihe von Standardprotokollen, wie sie bei Harlow und Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY, 1988) gelehrt werden oder wie sie bei Hudson und Souriau, Expert Opin. Biol. Ther. 1: 845-855 (2001) und bei Manoutcharian et al., Curr. Pharm. Biotechnol. 2: 217-223 (2001) erwähnt sind. Antikörper können mit radioaktiven Molekülen radiomarkiert werden oder kovalent gebunden werden, was ihren Nachweis mit radioaktiven Detektoren erlaubt, wie es bei Manoutcharian et al. oben beschrieben ist.
- 25
- 30

8) Markieren (tagging) ist eine andere Art, Veränderung in der Proteinexpression nachzuweisen und zu bestimmen. Beispielsweise kann das Gen, das für das Protein kodiert, technisch hergestellt (engineered) werden, um ein Hybridprotein zu produzieren, das eine nachweisbare Markierung (tag) enthält, so dass das Protein durch Erkennen der Markierung spezifisch nachgewiesen werden kann. Es sind Systeme erhältlich, die die direkte Bildgebung und quantitative Analyse von radioaktiven Markierungen erlauben, z. B. in Gelen, auf denen Proteine aufgetrennt wurden. Es können Unterschiede in der Expression durch Erkennen von Unterschieden in der Menge der vorhandenen Markierung in Test- und Kontrollproben bestimmt werden.

In Fällen, wo Probenmaterial äusserst beschränkt ist, wie bei gewissen Biopsie- oder Asservationsmethoden zur Gewebegewinnung aus Patienten in klinischen Situationen, oder wo die Untersuchung Nachweis der Analysatmoleküle mit der geringsten Häufigkeit umfassen sollte, sind die empfindlichsten Nachweisverfahren höchst wünschenswert. Von den oben genannten Verfahren ist der Nachweis von radioisotopmarkierten Proteinen durch geeignete Detektoren um mehrere Grössenordnungen empfindlicher als irgendein anderes Verfahren und deshalb das Mittel der Wahl.

25 Bildanalysensoftware

Es existieren einige aufwändige Softwarepakete für die Verarbeitung von graphischen oder digitalen Daten, die aus biologischen Studien erhalten sind, wie Proteingelanalyse oder Nukleinsäurearrayanalyse. Beispiele für Proteomanalyse umfassen die Produkte Phoretix 2C von Non-Linear Dynamics (Newcastle upon Tyne, UK), Delta 2D von Decodon GmbH (Greifswald, Deutschland), 3Z von Compugen (Tel-Aviv, Israel),

Gellab II+ von Scanalytics (Faifax, VA), BiImage von Genomic Solutions (Ann Arbor, MI), Melanie 3 von GeneBio (Genf), das Programm Keppler von Large Scale Biology Corporation (Vacaville, CA), der Java-fähige Browser des Programms CAROL (Freie Universität, Berlin), der
5 Gelbildkomparator Flicker 2D gel image comparator (Lemkin PF. Comparing two-dimensional electrophoretic gel images across the Internet. Electrophoresis, 18:461-470 (1997) und Bildanalyseprodukte, die von Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) verkauft werden.

10

Proteinidentifikation in der Proteomik

Massenspektrometrie gewinnt in der Proteomik zunehmend Bedeutung, nicht nur zur Identifizierung von Proteinen, die durch 2D-PAGE getrennt
15 wurden, sondern auch für den Direktnachweis und die relative Quantifizierung von Proteinen unabhängig von 2D-PAGE. Andere Verfahren zur Proteinidentifizierung umfassen Edman-Abbau, Aminosäureanalyse und andere Verfahren, die den Fachleuten bekannt sind. Viele dieser Verfahren beinhalten das Erfassen von Daten aus dem untersuchten Protein
20 und Vergleich dieser Parameter mit einer Liste von Parametern, die durch theoretische Analyse von Nukleinsäure- und Proteindatenbanken vorhergesagt sind.

Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. Proteomics: applications in basic
25 and applied biology. Curr. Opin. Biotechnol. 2000, 11:408-412.

Gygi SP, Aebersold R. Mass spectrometry and proteomics. Curr. Opin. Chem. Biol. 2000, 4:489-494.

Lee KH. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. Trends Biotechnol. 2001 Jun; 19(6):217-222.

30 Patterson SD. Proteomics: the industrialization of protein chemistry. Curr. Opin. Biotechnol 2000, 11:413-418.

Godovac-Zimmermann J, Brown LR. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. Mass Spectrom. Rev. 2001, 20:1-57.

5 P. James (Hrsg.) Proteome Research: Mass Spectrometry (Principles and Practice) 235 Seiten (Dez. 2000) Springer Verlag; ISBN: 3540672567.

Genomik

10

Es sind im Stand der Technik eine Reihe von Verfahren zum Nachweisen und Vergleichen der Ausprägung der Genexpression bei Zellen, Organismen oder Viren oder anderer transkriptionsaktiver Systeme bekannt.

15

Ein Standardverfahren für solche Vergleiche ist der Northern Blot. Bei dieser Technik wird RNA aus der Probe extrahiert und auf eine Reihe von für die RNA-Analyse geeigneten Gelen aufgebracht, die dann zur Auftrennung der RNA nach der Grösse durchgeführt werden.

20

Sambrook, J. et al., 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. 2. Aufl.

25

Die Gele werden dann geblottet (wie oben bei Sambrook beschrieben) und auf Proben für interessierende RNAs hybridisiert. Die Proben können radioaktiv oder nicht radioaktiv sein. Beispielsweise kann Hybridisierung mit der Probe durch Chemilumineszenznachweis der gebundenen Proben mit dem Genius System (Boehringer Mannheim Corporation, Mannheim, Deutschland) gemäss den Angaben des Herstellers betrachtet und analysiert werden.

30

Es kann eine gleiche Beladung der RNA in den Bahnen beispielsweise durch Anfärben der Ribosomen-RNA-Banden mit Ethidiumbromid bewertet werden. Alternativ können die

Proben radiomarkiert und autoradiographisch mit einer Probe für ein Gen und einem photographischen Film oder einem Phosphorimager oder gemäss der vorliegenden Erfindung mit Proben für mehr als ein Gen nachgewiesen werden.

5

Die RNA kann durch eine Reihe von Methoden verstärkt und dann nachgewiesen werden. Beispielsweise offenbart Marshall, US-Patent Nr. 5,686,272 die Verstärkung von RNA-Sequenzen mit der Ligasekettenreaktion LCR (ligase chain reaction). LCR ist von Landegren et al.,

10 Science, 241: 1077-1080 (1988); Wu et al., Genomics, 4: 560-569 (1989); Barany, in PCR Methods and Application, 1:5-16 (1991); und Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 189-193 (1991) beschrieben. Auch kann die RNA durch Reverstranskription in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt und dann durch LCR, Polymerasekettenreaktion
15 (PCR, polymerase chain reaction) oder andere Verfahren verstärkt werden. Ein Beispiel eines Verfahrens zur Durchführung der Reverstranskription von RNA ist im US-Patent Nr. 5,705,365 offenbart. Es wird Auswahl geeigneter Primer und PCR-Protokolle gelehrt, beispielsweise bei Innis, M. et al., Hrsg. PCR Protocols 1990 (Academic Press, San
20 Diego CA). Differentielle Expression von Messenger-RNA (mRNA) kann auch durch Reverstranskription von mRNA in cDNA verglichen werden, die dann durch Restriktionsenzyme gespalten und elektrophoretisch getrennt werden, so dass ein Vergleich der cDNA-Fragmente möglich ist, wie es bei Belavsky, US-Patent Nr. 5,814,445 gelehrt ist.

25

Typischerweise werden Primer am 5'-Ende mit Biotin oder einem der vielen Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Proben werden üblicherweise mit einem Enzym markiert, wie Rettich-Peroxidase (HRP, horse radish peroxidase) und alkalischer Phosphatase, siehe Levenson und Chang,
30 Nonisotropically Labelled Probes and Primers in: Innis et al., können aber auch z. B. mit Biotinpsoralen markiert werden. Ausführliche Beispielprotokolle zum Markieren von Primern und zum Synthetisieren von

enzymmarkierten Proben sind bei Levenson und Chang angegeben. Die Proben können auch mit radioaktiven Isotopen markiert werden. Ein beispielhaftes Protokoll zum Synthetisieren radioaktiv markierter DNA- und RNA-Proben ist in Sambrook ausgeführt. Es sind eine Reihe von Reagenzien zum Einbringen verschiedener Radionuklide in DNA-Proben verfügbar, darunter Enzymprecursorsubstrate mit ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S und anderen Elementen, die in natürlich vorkommenden Nukleinsäuren nicht vorhanden sind, wie z. B. radioaktives Iod. Ferner können Primer hergestellt werden, die einen grossen Bereich von anderen radioaktiven Elementen enthalten, die kovalent an den Primer gebunden werden, wie es den Fachleuten bekannt ist. Es sind eine Reihe von Verfahren zum Nachweis von PCR-Produkten bekannt. Allgemein ist ein Schritt enthalten, der Hybridisierung der Probe und des PCR-Produkts erlaubt, der gefolgt ist ein einem oder mehreren Entwicklungsschritten, um einen Nachweis zu ermöglichen.

Wenn eine radioaktiv markierte Probe verwendet werden soll, können PCR-Produkte, mit denen die Probe hybridisiert ist durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Als ein Beispiel kann biotinyliertes dUTP (Bethesda Research Laboratories, MD) bei der Verstärkung verwendet werden. Die markierten PCR-Produkte können dann auf einem Agarose getrennt werden, durch Southern-Transfer auf einen Nylonfilter gebracht und beispielsweise durch ein Detektorsystem mit Streptavidin/alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden. Ein Protokoll zum Nachweis eingebrachter biotinylierter dUTP ist z. B. bei Lo et al., Incorporation of Biotinylated dUTP, in: Innis et al. beschrieben. Schliesslich können die PCR-Produkte auf Agarosegels aufgegeben werden und Nukleinsäuren durch einen Farbstoff nachgewiesen werden, wie Ethidiumbromid, das spezifisch Nukleinsäuren erkennt.

30

Sutcliffe, US-Patent Nr. 5,807,680 lehrt ein Verfahren zum simultanen Identifizieren differentiell exprimierter mRNAs und Messung relativer

Konzentrationen. Die Technik, die die Bildung von cDNA mit Ankerprimern gefolgt von PCR umfasst, ermöglicht die Sichtbarmachung nahezu aller mRNA, die in einem Gewebe exprimiert ist, als deutliches Band auf einem Gel, dessen Intensität grob der Konzentration an mRNA entspricht.

Eine andere Gruppe von Techniken verwendet die Analyse der relativen Transkriptexpressionswerte. Jüngst wurden vier solcher Ansätze entwickelt, um umfassende Analyse mit hohem Durchsatz zu ermöglichen. Zunächst kann cDNA durch Reverstranskription aus RNA in der Probe erhalten werden (wie in den obigen Zitaten beschrieben) und einer einfachen Sequenzierung der 5'- und 3'-Enden unterzogen werden, um exprimierte Sequenzmarker (EST, expressed sequence tags) für die im Test exprimierten Gene und Kontrollproben zu definieren. Aufzählen der relativen Repräsentation der Marker von verschiedenen Proben ergibt eine Abschätzung der relativen Repräsentation des Gentranskripts in den Proben.

Zweitens wurde eine Variation von ESTs entwickelt, die als SAGE (serial analysis of gene expression) bekannt sind, die eine quantitative und gleichzeitige Analyse einer grossen Zahl von Transkripten ermöglicht. Die Technik verwendet die Isolierung kurzer diagnostischer Sequenzmarker und Sequenzieren, um Muster der Genexpressionscharakteristik einer Zielfunktion aufzuzeigen, und wurde verwendet, um Expressionswerte zu vergleichen, z. B. von tausenden von Genen in normalen und tumorösen Zellen. Siehe Velculescu, et al., Science 270: 368-369 (1995), Zhang et al., Science 276 : 1268-1272 (1997).

Drittens wurden Ansätze auf Basis des differentiellen Displays entwickelt. In diesen Ansätzen können durch spezifische Sequenzbegrenzer definierte Fragmente als einzige Identifikatoren für Gene verwendet werden, wenn sie mit Informationen über die Fragmentlänge in dem ex-

primierten Gen gekoppelt sind. Die relative Repräsentation eines exprimierten Gens in einer Zelle kann dann durch die relative Repräsentation des dem Gen zugeordneten Fragments abgeschätzt werden. Beispiele einiger Ansätze sind Restriktionsenzymanalyse von differentiell exprimierten Sequenzen (READS, restriction enzyme analysis of differentially expressed sequences) verwendet von Gene Logic Inc., und Gesamtgenexpressionsanalyse (total gene expression analysis) von Digital Gene Technologies Inc. CLONTECH, Inc. (Palo Alto, CA) vertreiben das Delta® Differential Display Kit zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene durch PCR. Ein anderes Verfahren ist das GeneCalling-System der CuraGen Corp., New Haven CT, das kombiniert Genidentifizierung mit Datenbankabfrage eines Restriktionsendonukleaseabdrucks, bestätigt durch vergleichende PCR unter Verwendung genspezifischer Oligonukleotide, wodurch Genisolationsprozeduren optimiert werden.

Viertens wird in bevorzugten Ausführungsformen der Nachweis durch eine einer Reihe von Techniken zur Hybridisierungsanalyse durchgeführt. In diesen Ansätzen wird RNA aus der interessierenden Probe einer Reverstranskription unterzogen, um markierte cDNA zu erhalten. Die cDNA wird dann hybridisiert, typischerweise mit Oligonukleotiden oder cDNAs bekannter Sequenz, die auf einem Chip oder einer anderen Fläche in bekannter Folge angeordnet werden. Die Lage des Oligonukleotids, das mit der markierten cDNA hybridisiert, gibt Sequenzinformationen zur cDNA, während die Menge der markierten RNA oder cDNA eine Abschätzung der Menge der relativen RNA oder cDNA in der ursprünglichen Probe gibt. Ferner ermöglicht die Technik gleichzeitige Hybridisierung mit zwei oder mehr verschiedenen nachweisbaren Markern, wie zwei oder mehr radiaktiven oder fluoreszierenden Markern, gemäß dem Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung. Die Hybridisierungsergebnisse ergeben einen direkten Vergleich der relativen Expression der Proben. Der Stand der Technik wird als Übersicht von King und Sinha, JAMA

286: 2280-2208 (2001) und Jain, Science, 294:621-623 (2001) und deren Literaturzitate gegeben.

Es sind im Handel eine Reihe von Kits zur Hybridisierungsanalyse erhältlich. Diese Kits ermöglichen eine Identifizierung spezifischer RNA- oder cDNA-Moleküle auf hochdichten Formaten, darunter Filter, Mikroskopieplättchen, Mikrochips und Techniken der Massenspektrometrie. Beispielsweise vertreibt Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA) GeneChip® Probearrays, die tausende unterschiedlicher Oligonukleotidproben bekannter Sequenzen, Längen und Lokationen im Array für hochpräzise Sequenzierung von Genen enthält. Synthetische Oligonukleotidarrays kombiniert mit PCR-Verfahren können Transkriptionsverhältnisse bei einer Kopie pro Zelle in komplexen biologischen Proben nachweisen, und eine Tintenstrahloligonukleotidarraytechnik kann zur genauen Anwendung eingesetzt werden. Siehe Hughes, T.R., et al., Nature Biotechnology, 19: 342-347 (2001). CLONTECH's Atlas® cDNA-Expressionsarray ermöglicht Messung der Expressionsmuster von 588 ausgewählten Genen. Der Gene Discovery Modul von Hyseq Inc. (Sunnyvale, CA) ermöglicht Screening von RNA mit hohem Durchsatz, ohne vorherige Sequenzinformationen bei einer Empfindlichkeit von 1 mRNA-Kopie pro Zelle. Incyte Pharmaceuticals Inc. (Palo Alto, CA) bietet Mikroarrays an, die beispielsweise geordnete Oligonukleotide von menschlichem Krebs und Signaltransduktionsgene enthält. Von anderen Firmen verwendete Techniken werden z. B. in Service, R.; Science 282: 396-399 (1998) und in Clarke P.A. Biochem. Pharmacol., 62:1311-1136 und deren Zitaten diskutiert.

Messung radioaktiver Strahlung

Die ersten elektrischen Geräte, die zum Strahlungsnachweis entwickelt wurden, waren Ionisationsdetektoren. Diese Instrumente beruhen auf dem direkten Einfang von Elektronen und Ionen, die in einem Gas durch Strahlung erzeugt werden. Es gibt zwei grundsätzliche Typen von Detektoren, die als Ionisationskammer und Proportionalzähler bekannt sind.

- 10 Ein anderes Nachweisgerät ist der Szintillationsdetektor. Er beruht auf der Tatsache, dass gewisse Materialien, wenn sie von einem Nuklearteilchen oder von Strahlung getroffen werden, eines oder mehrere Photonen, d. h. eine Szintillation emittieren. Diese Szintillationen können bei Kopplung an ein Verstärkungsgerät, wie einen Photomultiplier, in elektrische Impulse umgewandelt werden, die dann analysiert und elektronisch gezählt werden können, um eine Information über die einfallende Strahlung zu liefern.

- 20 Auch Halbleiterdetektoren sind verbreitet verwendete Nachweisgeräte, die auf kristallinen Halbleitermaterialien beruhen, vor allem auf Silizium und Germanium. Diese Detektoren werden auch als Feststoffdetektoren bezeichnet. Das Funktionsprinzip von Halbleitern ist analog zu dem von Gasionisationsgeräten. Anstelle eines Gases ist das Medium ein festes Halbleitermaterial. Der Vorteil von Halbleiterdetektoren im Vergleich zu Ionisationskammern ist ihre größere Energieauflösung.

Das folgende Lehrbuch beschreibt die Prinzipien von radioaktiven Nachweismethoden:

- 30 Knoll, G.F.: Radiation detection and measurements, 802 S., 3. Aufl. Dezember 1999, John Wiley and Sons, ISBN 0471073385.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Ortsverteilung von mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten mit jeweils mengenspezifischem Strahlungstyp auf einer gemeinsamen Trägerfläche, mit folgenden Schritten:
 - a) Ermitteln einer ersten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche,
 - b) Verändern der Intensität mindestens eines mengenspezifischen Strahlungstyps mit einem zugehörigen Veränderungsfaktor,
 - c) Ermitteln mindestens einer zweiten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche und
 - d) Berechnung der Ortsverteilungen jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln aus der ersten und der mindestens zweiten ermittelten Ortsverteilung.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Veränderungsschritt b) und der Schritt c) zur Ermittlung der mindestens zweiten Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche, vorzugsweise mit einem unterschiedlichen Veränderungsfaktor, mindestens einmal wiederholt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass eine ermittelte Ortsverteilung der Strahlungsintensität durch eine zugehörige Pixelmatrix dargestellt wird, wobei ein Pixelwert der Matrix die Strahlungsintensität eines zugehörigen Orts auf der Trägerfläche repräsentiert.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsverteilung jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln auf Basis der Pixelmatrizen bestimmt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsverteilung jeder der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten einzeln auf Basis von Intensitäten bestimmt wird, die sich durch die Summation von Pixelwerten definierter, insbesondere benachbarter, Elemente der Pixelmatrix ergeben.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass jede Menge von Punktstrahlungsobjekten aus mindestens einem strahlenden, insbesondere radioaktiv strahlenden, Typ von Isotopen besteht.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass jede Menge von Punktstrahlungsobjekten aus lichtemittierenden, insbesondere fluoreszierenden, phosphoreszierenden und/oder lumineszierenden, Substanzen besteht.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für mindestens eine Menge unterschiedlicher Punktstrahlungsobjekte an mindestens einem Ort auf der Trägerfläche mindestens ein Kalibrierungspunkt mit bekannter Strahlung vorhanden ist.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis der Veränderungsfaktoren der mengenspezifischen Strahlungstypen zwischen 5% bis 90%, vorzugsweise zwischen 10% bis 70%, insbesondere zwischen 15% und 50%, liegt.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Veränderungsfaktor durch Verwendung mindestens eines Absorbers realisiert wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Veränderungsfaktor durch radioaktiven Zerfall der Punktstrahlungsobjekte der mindestens zwei Mengen realisiert wird, wobei vorzugsweise die jeweiligen Punktstrahlungsobjekte der mindestens zwei Mengen unterschiedliche Halbwertszeiten aufweisen.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Veränderungsfaktor durch eine unterschiedliche Empfindlichkeit eines zur Ermittlung einer Ortsverteilung der Strahlungsintensität der Trägerfläche verwendeten Detektors für den jeweils mengenspezifischen Strahlungstyp der mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten realisiert wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsverteilungen mit einem ortsauflösenden Detektor für Alpha-, Beta-, Gamma- und/oder Röntgenstrahlung ermittelt werden.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsverteilungen mit einem sogenannten Phosphor-Imager-Detektor ermittelt werden.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Phosphor des Phosphor-Imager-Detektors zusätzlich Atome mit hoher Ordnungszahl Z , insbesondere Blei, enthält.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die erste und die mindestens zweite Ortsverteilung der Strahlungsintensität mit einem gleichartigen Detektor ermittelt wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei zu analysierende Stoffe mit jeweils einer Menge von Punktstrahlungsobjekten markiert, die so markierten Stoffe gemischt und das Gemisch anschließend auf die Trägerfläche, insbesondere in Form eines flächenartigen Analysemittels, aufgebracht wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die zu analysierenden Stoffe Peptide, Proteine und/oder Oligonukleotide sind.

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Analysemittel ein Proteingel, Nukleinsäure-Array, Protein-Array, ELISA-Array und/oder ein Blot ist.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Ortsverteilung
5 von mindestens zwei Mengen von Punktstrahlungsobjekten mit jeweils
mengenspezifischem Strahlungstyp auf einer gemeinsamen Trägerflä-
che.

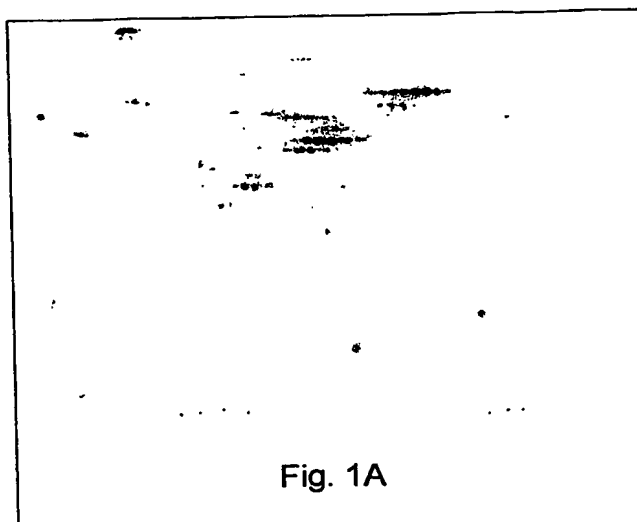


Fig. 1A

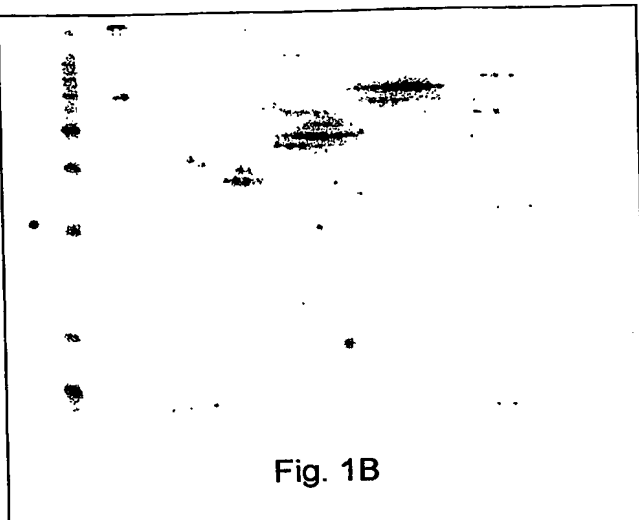


Fig. 1B

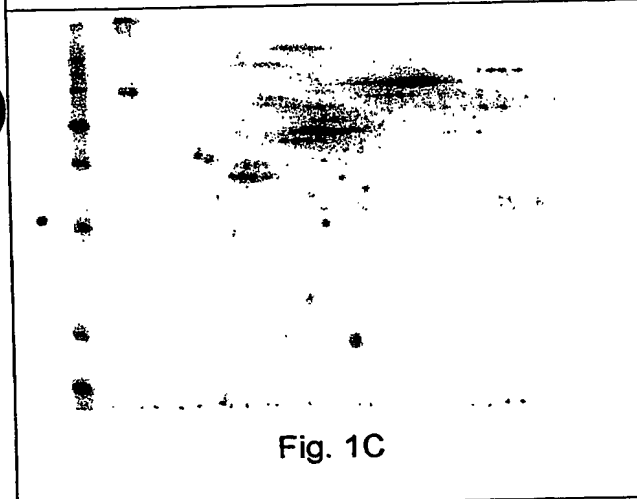


Fig. 1C

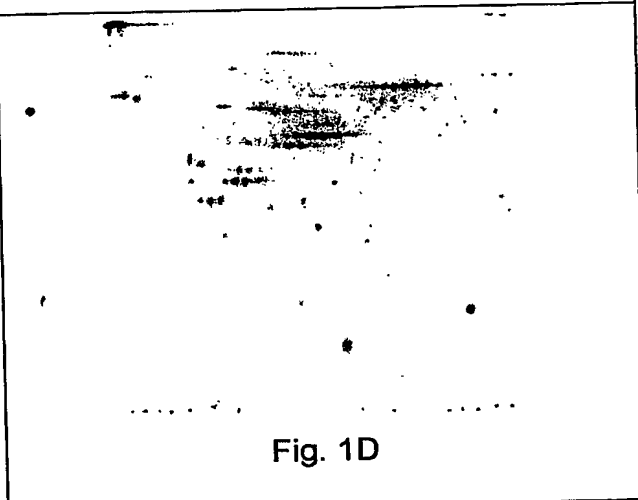


Fig. 1D

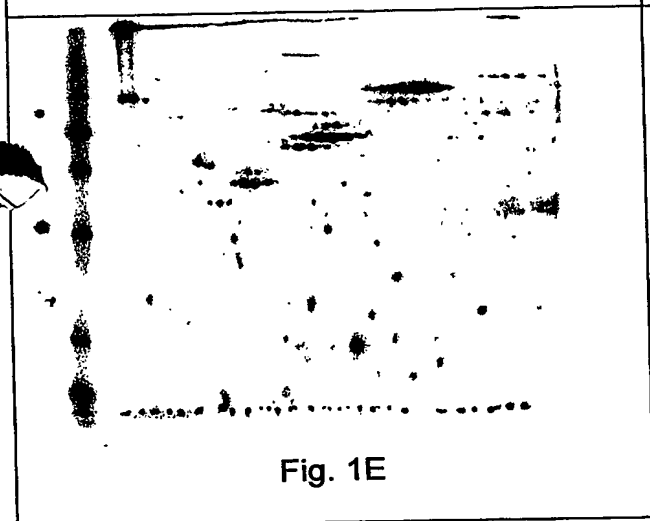


Fig. 1E

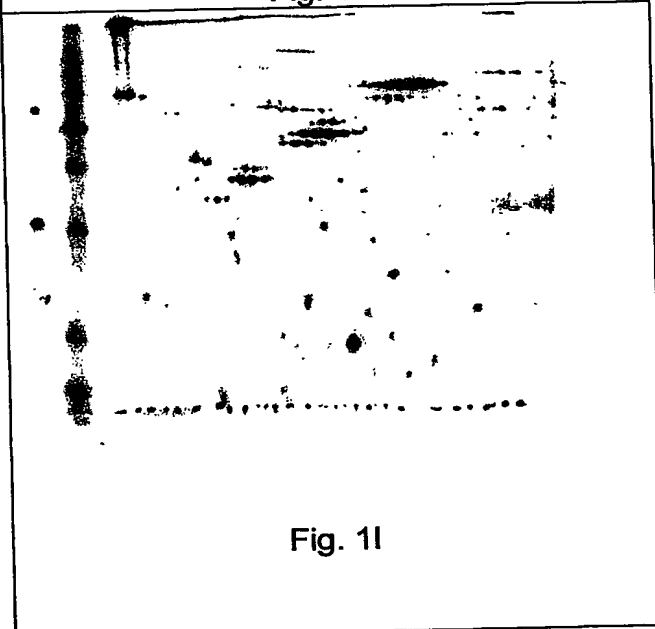
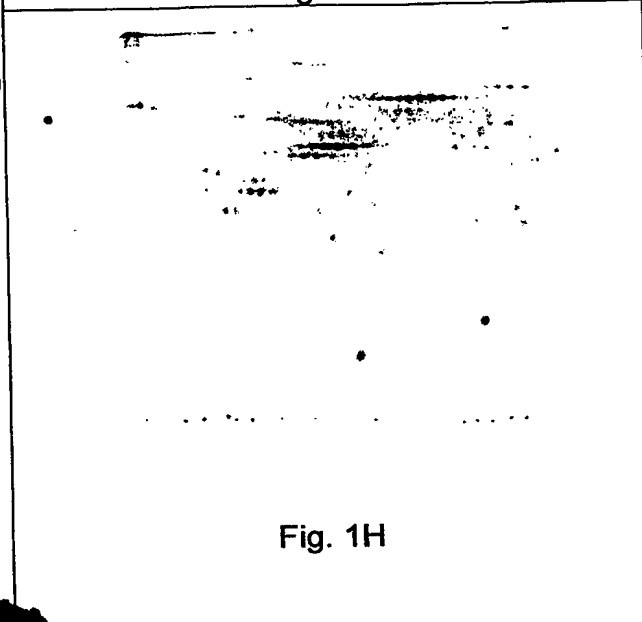
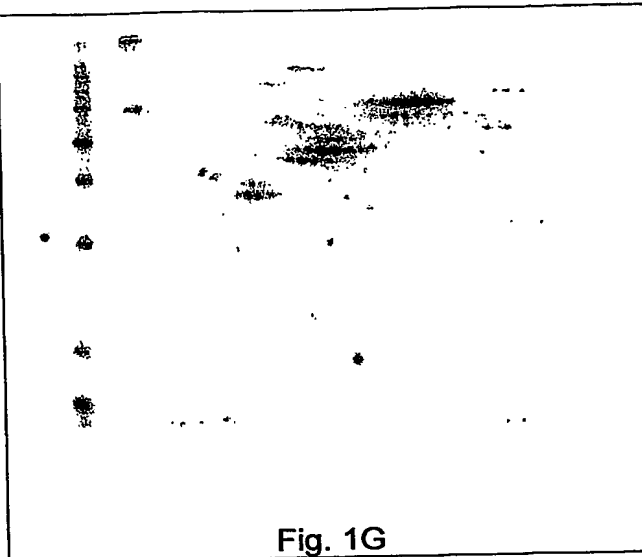
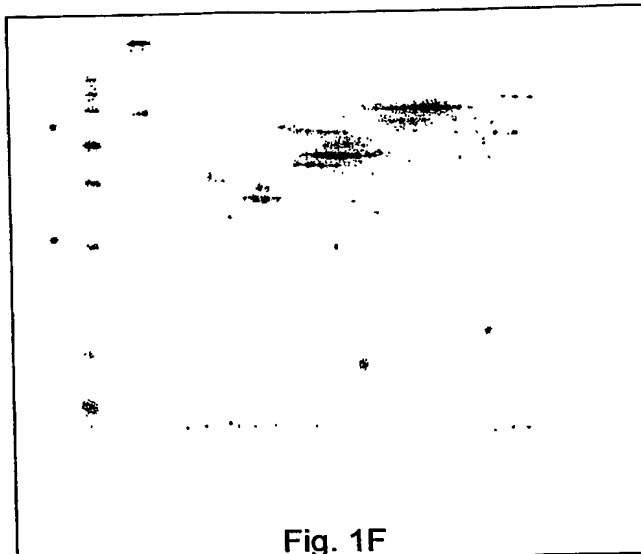




Fig. 2A



Fig. 2B



Fig. 2C



Fig. 2D



Fig. 2E